LOKALISATION, CHARAKTERISIERUNG UND PHYSIOLOGISCHES VERHALTEN DES ANGIOTENSIN I 'CONVERTING ENZYME'

Hans Schweisfurth

1975

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546706_0026

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Vorstände: Prof.Dr.med. K. Thurau
Prof.Dr.med. E. Gerlach
Prof.Dr.med. G. ten Bruggencate

LOKALISATION, CHARAKTERISIERUNG UND PHYSIOLOGISCHES VERHALTEN DES ANGIOTENSIN I 'CONVERTING ENZYME'

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hans Schweisfurth

aus

Hilchenbach

1975

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Priv.Doz. Dr. H. Dahlheim

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Fritz

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16. 12. 1975

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I	Einleitung und Problemstellung	1
II	Zur Messung der converting enzyme-Aktivität	7
	a) Reaktionskinetische Messung der converting enzyme-Aktivität	10
	b) Bestimmung von kleinen converting enzyme-Aktivitäten im Mikroliterbereich	11
	α) nach Cushman und Cheung	16
	β) nach Piquilloud, Reinharz und Roth	18
III	Ergebnisse und Diskussion	23
	a) Verteilung der converting enzyme-Aktivität in verschiedenen Organen der Ratte	23
	b) Lokalisation und Charakterisierung der Lungen-converting enzyme-Aktivität	27
	c) Funktion und Lokalisation der renalen converting enzyme-Aktivität	28
	d) Verhalten der converting enzyme-Aktivität nach Renin-Stimulierung	53
	α) Converting enzyme-Aktivität nach temporärer Abklemmung einer Nierenarterie	53
	β) Converting enzyme-Aktivität bei experimenteller Hämorrhagie	59
	e) Bestimmung der Plasma-converting enzyme-Aktivität bei Gesunden und Kranken	60
IV	Zusammenfassung	63
V	Alphabetische Zusammenstellung der verwendeten Abkürzungen	65
VI	Literatur	66

I) Einleitung und Problemstellung

Als erste Komponente des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) wurde 1898 das Renin als eine in Nierenrinden enthaltene, mit Wasser extrahierbare blutdrucksteigernde Substanz beschrieben (83). Erst etwa 50 Jahre später konnten L.T. Skeggs et al. (48, 74, 75) im Pferdeplasma das "converting enzyme" (c.e.) nachweisen.

Von dem Dekapeptid Angiotensin I (A I), dem Substrat des c.e., wird enzymatisch das Dipeptid Histidyl-Leucin (His-Leu) C-terminal unter Bildung des Oktapeptids Angiotensin II (A II) abgespaltet.

Im folgenden Schema ist das RAS, insbesondere Bildung und Abbau des A II, vereinfacht dargestellt:

$$\text{Reninsubstrat} \xrightarrow{\text{Renin}} \text{A I} \xrightarrow{\text{c.e.}} \text{A II} \xrightarrow{\text{Angiotensinasen}} \text{Spaltprodukte}$$

Aus dem in der Leber* synthetisierten Reninsubstrat (Angiotensinogen), einem Glykoprotein der α_2-Globulinfraktion, wird durch das Enzym Renin das Dekapeptid A I gebildet, das darauf mit Hilfe des c.e. in das Oktapeptid A II umgewandelt wird. A II wird durch unspezifisch wirksame Peptidasen, den sogenannten "Angiotensinasen", unter Bildung kleinerer Peptide abgebaut.

Da das Renin hauptsächlich in der Niere vorkommt, wird angenommen, daß das RAS intrarenal wirksam ist. Dazu ist auch eine ausreichend hohe renale c.e.-Aktivität erforderlich, da A II die einzige biologisch wirksame Komponente dieses Systems ist.

Ng und Vane konnten jedoch nach einer A I-Infusion in die A. renalis keine erhöhte A II-Aktivität im Nierenvenenblut nachweisen, so daß sie eine intrarenale Funktion des RAS bezweifelten (6, 57, 58). Diese Annahme wurde später von mehreren Arbeitsgruppen widerlegt (20, 24, 28, 37, 53, 60, 63). Beim Hund wurde

*Von Morris et al. (54) wurde kürzlich Reninsubstrat in Granula der Nierenrinde der Ratte nachgewiesen.

die Umwandlung von A I zu A II durch die enzymatische Wirkung von Lungenextrakten nachgewiesen (5).

Im menschlichen, mit Herzkathetern abgenommenen Lungenblut wurde ebenfalls c.e.-A. ermittelt. Dabei wurde eine 20- bis 40-prozentige Angiotensin-Konvertierung bei Gesunden beobachtet (8). Zu gleichartigen Ergebnissen kam man beim Hund (35, 60).

C.e.-Aktivitäten wurden auch extrarenal in einer Reihe von Organen bestimmt. Die höchsten sind nach Untersuchungen von D. Cushman an der Ratte im Nebenhoden enthalten (17). Auch im Hypophysenhinterlappen und im Corpus striatum wurde c.e. festgestellt (98). Die Plasmaaktivitäten des c.e. sind speziesabhängig. Die höchsten wurden beim Meerschweinchen, die niedrigsten beim Hund gemessen (96). Auch Mikroorganismen wie Coryne bacterium equi (47), Bazillus subtilis (82) und E. coli (99) synthetisieren c.e.

Die Isolierung bzw. Anreicherung des c.e. ist von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben worden. Cushman et al. (17) stellten c.e. aus Kaninchenlunge, Igic und Mitarbeiter aus Hundelunge her (40, 42). Andere Autoren extrahierten c.e. aus menschlicher Lunge und Schweineniere (56, 63).

Über das Molekulargewicht (MG) des c.e. werden unterschiedliche Angaben gemacht. Erdös ermittelte für das c.e. aus Schweinelunge ein MG von 206 000, das aus Untereinheiten von etwa 70 000 besteht (56). Von anderer Seite wurden für das c.e. unterschiedlicher Herkunft Werte zwischen 140 000 und 480 000 angegeben (26, 45, 46, 77, 81, 91).

A II wirkt auf die glatte Muskulatur der Gefäße, des Darmes und des Uterus sowie auf die Herzmuskulatur. Eine intravenöse A II-Injektion verursacht beim Menschen ine 4- bis 8-fach höhere Blutdrucksteigerung als Noradrenalin gleicher Dosis (31). Ausserdem wirkt A II positiv inotrop (27, 44). Die glatte Darmmuskulatur wird bei den verschiedenen Spezies unterschiedlich beeinflußt (32, 43, 69).

A II stimuliert die Aldosteronausschüttung der Nebennierenrinde, was bereits 1957 von F. Gross beschrieben wurde (30, 51). Der genaue Wirkungsmechanismus ist jedoch bislang nicht vollständig aufgeklärt.

A II soll auch die Katecholaminausschüttung aus dem Nebennierenmark aktivieren (67).

In den letzten Jahren wurde die Wirkung des A II auf das Nervensystem von mehreren Autoren untersucht. A II fördert die Ausschüttung des antidiuretischen Hormons aus dem Hypophysenhinterlappen (55) und auch die Freisetzung der Transmittersubstanzen Acetylcholin und Noradrenalin aus den ganglionären parasympathischen oder sympathischen Fasern (65, 66).

Eine besondere Bedeutung kommt dem intrarenalen RAS zu. Da das Renin hauptsächlich in den epitheloiden Zellen der afferenten Arteriolen lokalisiert ist, wird angenommen, daß das unter Mitwirkung des c e. gebildete vasokonstriktorisch wirksame A II den Widerstand der Vasa afferentes erhöht, was zur Verminderung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) führt. Die afferente Arteriole ist der Macula densa, spezialisierten Zellen des frühen distalen Tubulus, benachbart. Es wird daher postuliert, daß die intrarenale Reninaktivität von der Zusammensetzung der tubulären Flüssigkeit, insbesondere der NaCl-Konzentration, beeinflußt wird (86, 87, 89). Durch Mikropunktionsuntersuchungen wurde festgestellt, daß die Reninaktivität im Bereich des juxtaglomerulären Apparates (JGA)* mit zunehmender NaCl-Konzentration im frühen distalen Tubulus erhöht wird (88). Es wurde jedoch auch behauptet, daß eine abnehmende tubuläre NaCl-Konzentration die Reninsekretion stimuliert (78). Jedoch sind diese Befunde nicht

*Als JGA werden folgende Strukturen der Nierenrinde bezeichnet. Glomerulärer Gefäßpol mit V. afferens und V. efferens, Lacis-Zellen sowie Macula densa des frühen distalen Tubulus.

durch Mikropunktionsuntersuchungen gesichert.

Die Plasma-Reninaktivität (PRA) ist vom extrazellulären Volumen abhängig (92). Bei Verminderung des Extrazellulärraumes, z.B. bei Blutverlust, wird die PRA erhöht. Tobian nahm an, daß die Reninfreisetzung über die juxtaglomerulären (epitheloiden) Zellen beeinflußt wird, die als Druckrezeptoren wirken (84). Ein zunehmender arterieller Druck soll durch Dehnung dieser Zellen die Reninausschüttung hemmen. Mit abnehmendem Druck wird die Reninfreisetzung erhöht (85).

Daneben wurde eine Einwirkung des A II auf die Na-Rückresorption des distalen Tubulus postuliert. B. Ochwadt perfundierte die peritubulären Kapillaren des distalen Konvolutes mit Hypertensin und stellte dabei eine verminderte Na-Rückresorption fest (59).

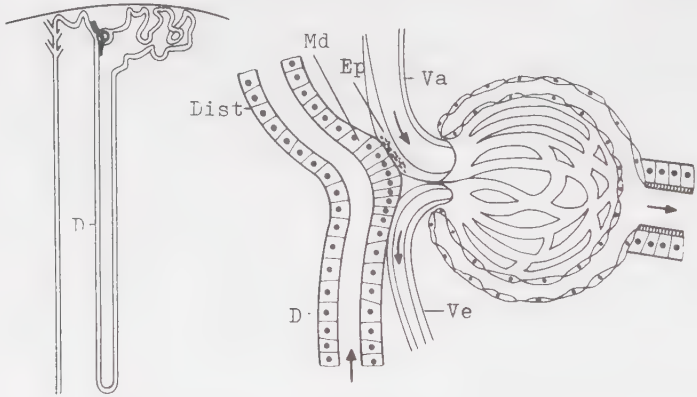

Abb. 1: Halbschematische Darstellung des juxtaglomerulären Apparates. Dist = distales Konvolut; D = aufsteigender, dicker Teil der Henle-Schleife; Md = Macula densa-Zellen; Va = Vas afferens; Ve = Vas efferens; Ep = epitheloide Zellen

Ein gleichartiger Befund wurde von K. Steven am proximalen Tubulus der Ratte ermittelt (80). Neuerdings wird auch eine Wirkung des A II auf die glomeruläre Proteinpermeabilität diskutiert (22).

Mit der vorliegenden Arbeit wird beabsichtigt, einen Beitrag zur Physiologie des c.e. zu liefern. Um das Verhalten dieses Enzyms in den Mikrostrukturen (z.B. JGA), in denen eine physiologische Wirkung des RAS postuliert wird, untersuchen zu können, mußte eine Mikromethode entwickelt werden, mit der Verteilung, Mikrolokalisation, die charakteristischen Eigenschaften und das physiologische Verhalten des c.e. untersucht werden können. Weiterhin war herauszufinden, ob die in den einzelnen Geweben enthaltenen Enzymaktivitäten von einem Enzym oder verschiedenen Isoenzymen stammen.

Zur Klärung der Frage, ob das c.e. bei Reninstimulierung verändert wird, sollte außerdem das Verhalten des Enzyms bei NaCl-reicher und -armer Diät, bei experimenteller Hämorrhagie und einseitiger Nierenabklemmung gleichzeitig mit dem Renin gemessen werden.

Da das A II die einzige biologisch wirksame Komponente des RAS ist, wäre es sehr nützlich, wenn zum Studium der Funktion dieses Systems direkt A II-Aktivitäten in den Strukturen gemessen werden, in denen das Oktapeptid wirksam wird. Da die quantitative Erfassung des A II in mikrodissezierten Gewebspartikels noch nicht möglich ist*, wird daher meistens aus dem Verhalten des Renins auf die jeweilige A II-Aktivität geschlossen. Wie jedoch aus der schematischen Darstellung des RAS (s.o.) hervorgeht, ist die A II-Bildung von folgenden Größen abhängig:
1. Von der Reninsubstratkonzentration, 2. der Reninkonzentration, 3. der c.e.-A., 4. der Angiotensinaseaktivität und 5. von enzymatischen Effektoren.

*Von F. Mendelsohn wurde kürzlich eine radioimmunologische Methode beschrieben, mit der die A II-Aktivität im Gewebshomogenat einer Rattenniere bestimmt werden kann, die etwa 30 000 JGA's enthält (52).

Für das Plasma wird vielfach die A I-Bildung als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt angesehen, da Reninsubstrat und c.e.-A. in ausreichendem Maße im Blut enthalten sein sollen. Die Reninaktivität wird oft allein als Maß der A II-Bildung betrachtet. In der Niere erfolgt die A II-Bildung wahrscheinlich extravasal im Bereich der JGA's. Deshalb ist nicht die Plasma-c.e.-A., sondern die Enzymaktivität im Bereich der JGA's wirksam, so daß man in diesem Fall aus der Reninaktivität allein nicht auf die A II-Bildung rückschließen kann. Daher ist es notwendig, alle an der A II-Bildung beteiligten Komponenten zu untersuchen. Es ist bereits möglich, Renin- und Angiotensinaseaktivitäten von einzelnen JGA's zu bestimmen, so daß nun angestrebt wird, zusätzlich die c.e.-A. in diesen Gewebsstrukturen zu messen.

II) Zur Messung der converting enzyme-Aktivität

Bisher wurden indirekte Bestimmungsmethoden verwendet, um die c.e.-A. nachzuweisen. Dabei wird die A II-Bildungsgeschwindigkeit mit Hilfe eines synthetischen oder des natürlichen Substrates A I ermittelt und als Maß für die c.e.-A. angesehen.

Zur Bestimmung der c.e.-A. von einzelnen mikrodissezierten Gewebsstrukturen wurden zunächst Makromethoden auf ihre Verwendbarkeit hin untersucht.

C.e.-A. kann unter Verwendung des natürlichen Enzymsubstrates A I biologisch (Angiotensin-Rattentest) oder radioimmunologisch bestimmt werden. Bei Verwendung von synthetischen Substraten ist auch eine physikochemische (fluorimetrische oder photometrische) Messung der Reaktionsgeschwindigkeit möglich. Da auch A I blutdrucksteigernd wirkt (79), ist für den Rattentest eine vorherige quantitative Trennung der Angiotensine A I und A II notwendig. Dazu eignet sich besonders das von R. Boucher entwickelte Verfahren (11), bei dem die beiden Peptide an einem DOWEX-Kationenaustauscher getrennt werden. Hierbei werden die Peptide mit dem Aminoende gebunden, so daß sie durch Aminopeptidasen nicht weiter abgebaut werden können. Da im Plasma vornehmlich Aminopeptidasen enthalten sind, ist die Boucher-Methode sehr gut zur Ermittlung der Plasma-c.e.-A. geeignet. Die im Plasma vorhandenen Carboxypeptidasen sind nicht stabil und werden durch eine Vorinkubation bei 37° C ausgeschaltet. Die Aktivitätsbestimmung des c.e. in Geweben ist bei Verwendung des Substrates A I dadurch erschwert, daß die in den Proben enthaltenen Angiotensinasen bislang nicht ohne Einwirkung auf die c.e.-A. blockiert werden können. Diese Schwierigkeit läßt sich durch Verwendung von synthetischen Substraten vermeiden. Allerdings ist es denkbar, daß in den Proben enthaltene Pseudoenzyme, die A I nicht konvertieren können, durch Reaktion mit dem synthetischen Substrat c.e.-A. vortäuschen.

Die ersten synthetischen Substrate enthielten wie das A I endständig His-Leu.

M. Roth verwendete zur fluorimetrischen Bestimmung Z-Pro-Phe-His-Leu* und Z-Phe-His-Leu, von denen enzymatisch das Dipeptid His-Leu abgespaltet wird (68).

D. Cushman synthetisierte Hip-His-Leu**, von dem unter Einwirkung des c.e. die Hippursäure freigesetzt, anschließend abgetrennt und photometrisch gemessen wird (16).

Auch Hip-Gly-Gly wurde von verschiedenen Autoren als c.e.-Substrat verwendet und die enzymatisch gebildete Hippursäure spektralphotometrisch bestimmt (94, 96). Außerdem wurden Verbindungen mit Chromophoren [Z-Phe(NO_2)-Gly-Gly] (94, 96), p(NO_2) Phenylalanin [t-BOC-pNO_2Phe-Phe-Gly]*** zur photometrischen Bestimmung der c.e.-A. benutzt (81).

Auch radioaktiv markiertes A I sowie A II wurden zur Messung der c.e.-A. herangezogen (35, 38, 40, 61). Huggins und Thampi benutzten A I, das endständig ^{14}C-Leucin enthielt. Nach der Umsetzung wurden das nicht umgesetzte A I, das abgespaltete Dipeptid His-Leu und A II chromatographisch getrennt und radiochemisch bzw. immunologisch quantitativ bestimmt (39). Boyd und Mitarbeiter bestimmten die c.e.-A. mit Hilfe von markiertem A I und A II radioimmunologisch (13).

In der Tabelle 1 sind die am meisten verwendeten c.e.-Substrate angegeben. Die vom c.e. gespaltene Bindung ist jeweils durch einen senkrechten Pfeil gekennzeichnet.

Grundsätzlich wird von allen Substraten ein endständiges Dipeptid (z.B. His-Leu, Gly-Gly etc.) abgespaltet. Vereinfacht kann man die Substrate als R-AS_1-AS_2-OH beschreiben. Dabei spaltet das c.e. den Molekülrest R von AS_1-AS_2 ab. R kann aus einem Peptid oder aus einer anderen Verbindung bestehen. AS_2

*Z: Benzyloxycarbonyl

**Hip: Hippuryl

***t-BOC: t-butyloxycarbonyl

elle 1: Methoden zur Bestimmung der c.e.-A.

-Substrat	Abtrennung der Reaktionsprodukte durch	Nachweis der Reaktionsprodukte durch:	Autoren
otensin I ne↓His-Leu)	Gegenstrom-Verteilungsverfahren Dowex-Kationen-Austauscher Chromatographie Gegenstrom-Verteilungsverfahren Chromatographie physiko-chemisch	Rattenblutdruck-Test (A II) Rattenblutdruck-Test (A II) Rattenkolon (A II) Aortenstreifen (A II) Rattenuterus (A II) Radiometrisch (A I u. His-Leu) und Aortenstreifen (A II) Radioimmunoassay (A II)	L.T. Skeggs (74) R. Boucher (11) E.G. Erdös (96) O. Helmer (36) F.M. Bumpus (14,15) C.G. Huggins (39) G.W. Boyd (13)
dykinin ro↓Phe-Arg)		Rattenuterus	H.Y.T. Yang (93)
thetische Substrate:			
↓His-Leu	Ausschütteln mit Äthylacetat	U-V spektralphotometrisch (Hip)	D. Cushman (16), E.G. Erdös (96)
↓Gly-Gly OC-Phe(NO_2)↓Phe-Gly ne↓His-Leu ro-Phe↓His-Leu ro↓Leu-Gly ne(NO_2)↓His-Leu ne(NO_2)↓Gly-Gly (NO_2)↓Gly-Gly	Ausschütteln mit Äthylacetat Komplexbildung mit PDA Chromatographie Chromatographie und Sephadex	U-V spektralphotometrisch (Hip) U-V spektralphotometrisch fluorimetrisch (His-Leu) Aminosäure-Analysator (His,Leu) U-V spektralphotometrisch	E.G. Erdös (40,94,96) E.G. Erdös (40,94,96) Y. Piquilloud (68) E.G. Erdös (40,96) R.L. Stevens (81)
ere Substrate: lin (B-Kette) ro28↓Lys29-Ala30) 20 475 rp↓Ala-Pro)			R. Igic (40) H.S. Cheung (18)

: Hippuryl, t-boc: t-butyloxycarbonyl, Z: Benzylocycarbonyl, PDA: Phthaldialdehyd

sollte eine Aminosäure mit einer freien endständigen Carboxylgruppe (nicht Glutamin), AS_1 kann jede Aminosäure außer Prolin sein (23, 94). Verbindungen mit Prolin in der Stellung AS_1 werden durch c.e. nicht gespalten. A II wird durch c.e. nicht weiter abgebaut, da Pro^7 die Abspaltung eines weiteren Dipeptids verhindert (94).

a) Reaktionskinetische Messung der c.e.-A:

Da c.e.-Antikörper nur in beschränktem Umfang zur Verfügung stehen, müssen c.e.-Aktivitäten auf indirektem Wege durch reaktionskinetische Messung der A II-Bildung oder anderer Reaktionsprodukte bestimmt werden. Für die Routineuntersuchung am besten geeignet sind optische Methoden, die in klinisch-chemischen Laboratorien vorwiegend verwendet werden. Da das Dipeptid His-Leu relativ einfach fluorimetrisch nachweisbar ist, wird die Bildungsgeschwindigkeit dieser Komponente gern zur Bestimmung herangezogen. Spektralphotometrisch wird nicht das freigesetzte Dipeptid, sondern der abgespaltete Rest eines synthetischen Substrats, z.B. Hippursäure, gemessen.

Bei dem spektralphotometrischen Verfahren wird die Konzentration der gelösten lichtabsorbierenden Verbindung über die Extinktion mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes ermittelt.

Durchsetzt ein weißer Lichtstrahl eine Flüssigkeit, so ist die Intensität der austretenden Strahlung kleiner als die der eintretenden. Dabei verhält sich die Extinktion E proportional zu der Konzentration c ader absorbierenden Teilchen, die sich im Strahlengang befinden. Dieses Phänomen wird quantitativ durch das Lambert-Beer'sche Gesetzt beschrieben, wobei die Extinktion E_λ als der Logarithmus des Quotienten $\frac{I_o}{I}$ definiert ist.

$$E_\lambda = \log\frac{I_o}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

I_o: Intensität des eintretenden monochromatischen Lichtstrahls

I: Intensität des austretenden monochromatischen Lichtstrahls

ε: Extinktionskoeffizient

d: Schichtdicke.

b) Spektralphotometrische Bestimmung von kleinen c.e.-A. im Mikroliterbereich:

Die Spektralphotometer PMQ II und PM 4 (Fa. ZEISS) wurden für diese Untersuchungen verwendet. In Abb. 2 ist die Anordnung des PMQ II dargestellt. Als Strahlungsquelle dient eine Deuterium-Lampe (B), die an das Netzgerät (A) angeschlossen ist. Vom Eintrittsspalt des Gitter-Monochromators (C) wird ein Strahlenbündel ausgeblendet und von dem Monochromator in die einzelnen Wellenlängenbereiche zerlegt. Diese Strahlung durchdringt die Quarzküvette (D), die die Probelösung enthält. Die Intensität des durchgelassenen Lichtes wird mit einem Photomultiplier (E) gemessen und an dem Anzeigegerät (F) abgelesen. Zur kontinuierlichen Registrierung ist ein Kompensationsschreiber (Servogor, Fa. METRAWATT) (G) mit der Eingangsspannung 10 mV angeschlossen. Um Proben im Mikroliterbereich messen zu können, wurde eine in der Werkstatt des Physiologischen Instituts der Universität München hergestellte Mikroküvetteneinrichtung verwendet. An dem Gehäuse der Quarzküvette (D) wurde die Mikroküvette mit einem Halter befestigt, die aus einer in Teflon eingelassenen Kapillare mit einem Füllungsvolumen von ca. 10 µl besteht. Die Küvette wird mit einer Mikrolitersprize (HAMILTON) oder einer dünneren Kapillare gefüllt und die Enden mit dünnen Quarzplatten verschlossen. Mit dieser Mikroküvetteneinrichtung ist es möglich, Hippursäure bis zu 1 ng herab zu messen (Abb. 3). Bislang konnte die Hippur-

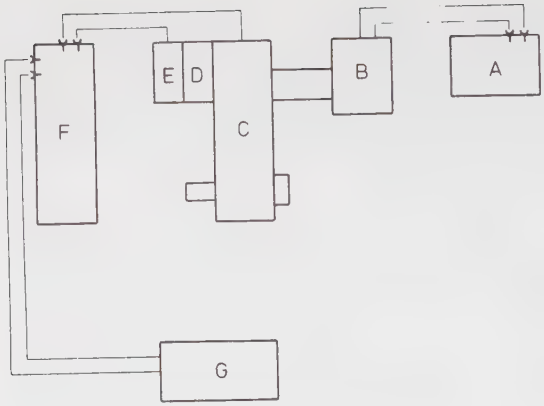

Abb. 2: Anordnung des Spektralphotometers PMQ II (ZEISS)

A: Netzgerät
B: Strahlungsquelle (Deuterium-Lampe)
C: Monochromator
D: Küvettengehäuse
E: Photomultiplier
F: Anzeigegerät
G: Registriergerät (Servogor, Fa. METRAWATT)

säure nur im Mikrogrammbereich nachgewiesen werden (Abb. 4). Trotz dieser Steigerung der Meßempfindlichkeit gelang es nicht, c.e.-A. von JGA's zu ermitteln. Daher wurde eine andere (fluorimetrische) Methode auf ihre Verwendbarkeit zur Messung von Mikro-c.e.-Aktivitäten untersucht.

Während bei der Lichtabsorption die Elektronen nach der Anregung sofort wieder in ihren energieärmeren Ausgangszustand zurückkehren, wird bei der Fluoreszenz ein Quantenzustand erreicht, der langsamer in den Grundzustand zurückgeht, da die angeregten Elektronen in Zwischenzuständen verweilen können. Im Vergleich zum anregenden Licht hat die erzeugte Fluoreszenzstrahlung längere Wellenlängen.

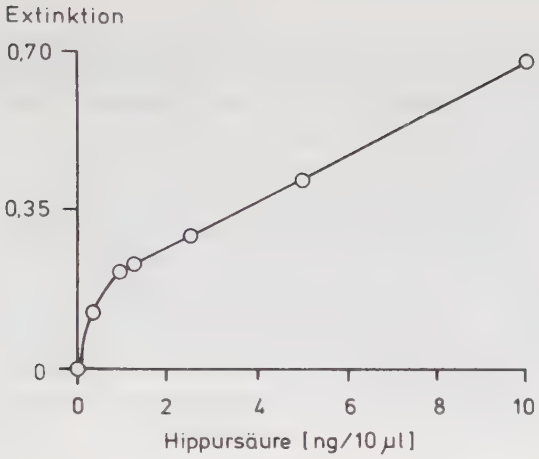

Abb. 3: Messung der Hippursäurekonzentration mit Hilfe der Mikroküvette (10 µl Meßlösung) im Spektralphotometer PMQ II (Fa. ZEISS) bei λ = 228 nm

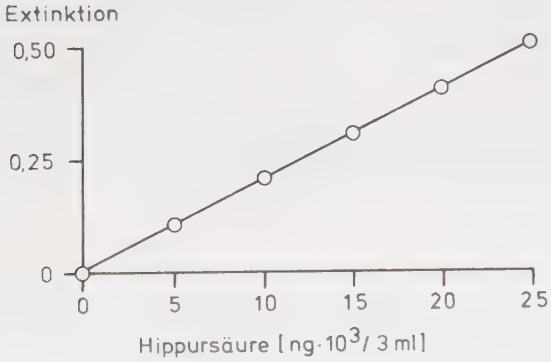

Abb. 4: Messung der Hippursäurekonzentrationen in einer Quarzküvette (3 ml Meßlösung) im Spektralphotometer PMQ II (Fa. ZEISS) bei λ = 228 nm

Die Fluoreszenzmessungen wurden mit Hilfe eines Zusatzgerätes (ZFM 4, Fa. ZEISS) mit dem Spektralphotometer durchgeführt. Es wurden zwei Anordnungen verwendet.

Anordnung I (Abb. 5):
Aus dem Licht einer Quecksilberlampe (1) wird durch einen Filter (3) ein monochromatischer Strahl der Wellenlänge 365 nm ausgeblendet, der seitlich in die Meßküvette eintritt. Das unten austretende Fluoreszenzlicht wird über einen Planspiegel (5) dem Monochromator zugeleitet, spektral zerlegt und dem Empfänger (6) zugeführt, der die Intensität dieser Strahlung ermittelt.

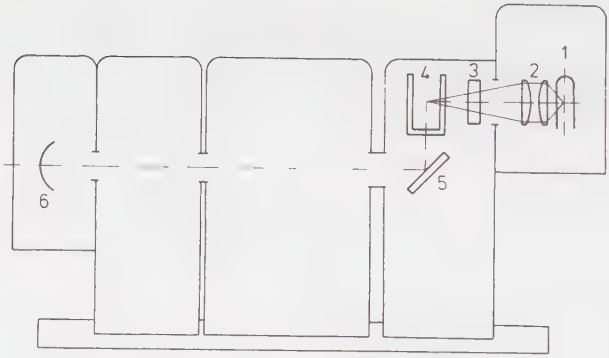

Abb. 5: Anordnung I zur Fluoreszenzmessung

1: Quecksilberlampe
2: Linsensystem
3: Filter für λ = 365 nm
4: Quarzküvette
5: Planspiegel
6: Photozelle

Anordnung II (Abb. 6):
Diese Anordnung ist gut zur Messung von sehr kleinen Konzentrationen geeignet. Von der Quecksilberlampe (1) kommend, läuft das anregende Licht zuerst über den Monochromator und dann durch den Küvettenboden in die Probelösung. Das seitlich ausfallende Fluoreszenzlicht wird über einen Filter dem Multiplier (6) zugeführt. Bei sehr geringen Konzentrationen konnte die Messung um das 10-fache verstärkt werden. Mit einem Kondensator von 1000 µF, der dem Schreiber parallel geschaltet war, konnte das bei der Verstärkung auftretende Rauschen gedämpft werden, so daß reproduzierbare Messungen auch bei großer Verstärkung möglich sind.

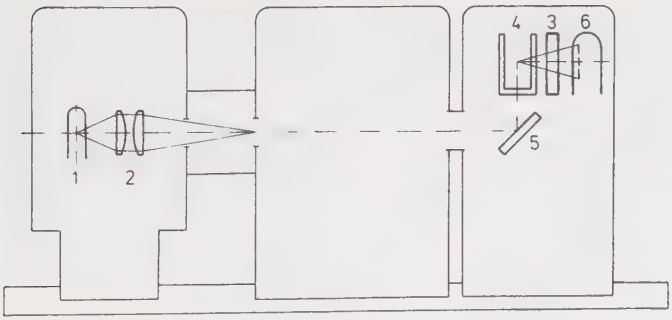

Abb. 6: Anordnung II zur Fluoreszenzmessung

1: Quecksilberlampe
2: Linsensystem
3: Filter für λ = 500 nm
4: Quarzküvette
5: Planspiegel
6: Vervielfacher (1 P 28)

α) Bestimmung der c.e.-A. nach Cushman und Cheung:

Bei dieser Methode wird als synthetisches Substrat Hippuryl-His-Leu (HHL) verwendet. Das Angiotensin I-c.e. spaltet hiervon das Dipeptid His-Leu ab. Die dabei entstehende Hippursäure wird mit Äthylacetat extrahiert und ihre Konzentration spektralphotometrisch bei 228 nm gemessen. Die Hippursäure hat ein Absorptionsmaximum bei 228 nm und ein Minimum bei 210 nm, während das UV-Spektrum des Substrats HHL von 205 bis 260 nm stetig abfällt (Abb. 7). Da im Bereich des Maximums der Hippursäure die Extinktion des HHL etwa gleich groß ist, muß vor der photometrischen Bestimmung die Hippursäure vom HHL quantitativ abgetrennt werden.

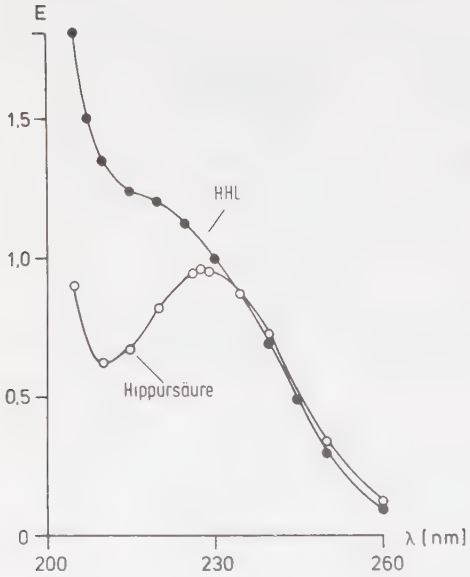

Abb. 7: UV-Absorptionsspektrum der Hippursäure und des Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin (HHL). Konzentration jeweils 0,1 m mol.

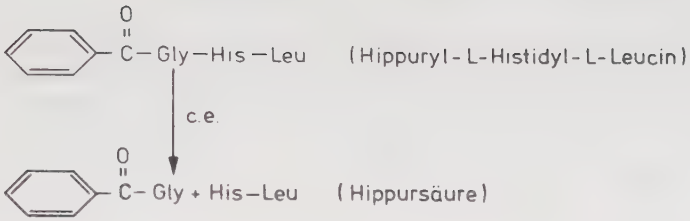

Abb. 8:

In Abb. 8 ist die Reaktion schematisch dargestellt. Das Inkubationsmedium besteht aus einem Kalium-Phosphat-Puffer (pH 8,3; 100 mmol), in dem NaCl (300 mmol) und das Substrat HHL (5 mmol) gelöst sind. Das Gesamtvolumen der Lösung beträgt 250 µl. Davon stammen 50 µl aus einer Substratstammlösung, die 232 mg HHL in 20 ml einer 25 mol NaOH (pH 8,3) gelöst enthielt. Anschließend wird etwa 10 µl der zu testenden Lösung zugegeben, wenn möglich, nicht länger als 30 Minuten bei 37° C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 25 µl einer 1 n HCl gestoppt. Die enzymatisch freigesetzte Hippursäure wird darauf mit 1,5 ml Äthylacetat extrahiert und der Extrakt nach kurzer Zentrifugation bei 500 g (2 Min.) mit 1 ml Äthylacetat versetzt und das Lösungsmittel abgedampft, wobei die Hippursäure zurückbleibt. Der Rückstand wird mit 1 ml aqua dest. aufgenommen und die Hippursäurekonzentration anschließend photometrisch bei 228 nm gemessen.

Diese Methode wurde auf ihre Verwendbarkeit zur Messung von Mikro-c.e.-Aktivitäten überprüft. Das Meßvolumen konnte zunächst auf 500 µl reduziert werden. Um noch geringere Volu-

men messen zu können, wurde eine in der Werkstatt des Physiologischen Instituts angefertigte Mikroküvette benutzt, die ein Füllvolumen von nur 10 µl hatte (s.o.).

Da die Hippursäure nicht quantitativ extrahiert werden kann und das zur Extraktion verwendete Äthylacetat selbst bei 228 nm absorbiert, wurde nicht versucht, die Meßempfindlichkeit noch weiter zu verbessern. Ein zur Abtrennung der Hippursäure geeignetes Lösungsmittel, das selbst nicht im Bereich von 228 nm absorbiert, konnte bislang nicht ausfindig gemacht werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Absorption von Lösungsmitteln bei 228 nm gegen aqua dest. gemessen

Lösungsmittel	Extinktion
Methanol	0,2
Äther	0,6
Äthylacetat	1,5

β) Bestimmung der c.e.-A. nach Piquilloud, Reinharz und Roth:

Als synthetisches Substrat verwendete diese Arbeitsgruppe Z-Phe-His-Leu und Z-Pro-Phe-His-Leu, von denen das endständige Dipeptid His-Leu enzymatisch abgespaltet wird. Die Reaktionsgeschwindigkeit dieser Umsetzung wird als Maß für die c.e.-A. angesehen (indirekte Methode). Dabei stellte sich heraus, daß Z-Phe-His-Leu schneller enzymatisch umgesetzt wird. Als Inkubationsmedium wurde Borax-Phosphat-Puffer (s.u.) (pH 8,0) verwendet, der 1% NaCl enthielt. Zu 3 ml dieser Lösung wurden 20 µl Substrat (2 mg/ml Methanol) und 20 µl der Probe mit der unbekannten c.e.-

A. hinzugegeben, eine Stunde bei 37° C inkubiert und die enzymatische Reaktion durch Erhitzen im siedenden Wasserbad (5 Min.) gestoppt. Zu der darauf schnell im Eisbad abgekühlten Lösung wurden 0,4 ml 2 n NaOH und 0,1 ml einer 0,1% Phthaldialdehydlösung (Fa. MERCK-SCHUCHARD) hinzugegeben. Zur Stabilisierung des Systems müssen nach Angaben der Autoren noch 0,2 ml 6 n HCl zugegeben werden. Das Reaktionsprodukt kann 30 - 90 Minuten später fluorimetrisch gemessen werden.

Diese Methode wurde so modifiziert, daß mit ihr auch Mikro-Enzymaktivitäten bestimmt werden können. Das Küvettenvolumen konnte von 3 ml bis auf 0,1 ml reduziert werden, wodurch die Konzentration des Phthaldialdehyd-His-Leu-Komplexes um das Dreißigfache erhöht wird. Abb. 9 zeigt, daß bei der verwendeten Meßküvette ein Volumen von 100 µl für eine Bestimmung ausreicht. Für die vorliegenden Untersuchungen reichte bereits ein Füllvolumen von 500 µl aus.

Als Substrat wurde bei den meisten Messungen Z-Phe-His-Leu (Fa. BACHEM, Kalifornien) verwendet.

Beschreibung des Meßvorganges: Das Inkubationsmedium bestand aus Borax-Phosphat-Puffer (0,05 mol Borax, 0,1 mol KH_2PO_4), der 1% NaCl und Z-Phe-His-Leu (100 µg/ml Methanol) gelöst enthielt. 10 µl der zu testenden Probe wurde zu 500 µl der Substrat-Pufferlösung hinzugesetzt, 1 Stunde bei 37° C inkubiert und die Reaktion durch Erhitzen im siedenden Wasserbad (5 Min.) und sofortiges Abkühlen mit zerkleinertem Eis gestoppt. Das enzymatisch abgespaltete Dipeptid His-Leu wurde durch Zugabe von 50 µl 2 mol NaOH und 25 µl Phthaldialdehyd (1 mg/1 ml Methanol) umgesetzt, diese Reaktion nach 4 Minuten mit 50 µl 6 n HCl beendet und die Konzentration des fluoreszierenden His-Leu-Komplexes mit Hilfe eines Fluorimeters bei 500 nm (Anregung: 365 nm) qualitativ bestimmt. Die zeitliche Abhängigkeit der Bildung des fluorimetrisch aktiven PDA-His-Leu ist aus der Abb. 11 er-

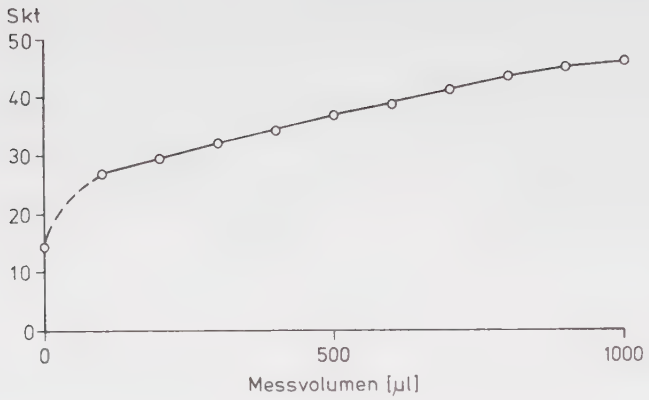

Abb. 9: Fluoreszenzmessungen am System c.e. (Hoden [10 µg/ml] der Ratte) und Z-Phe-His-Leu als Enzymsubstrat (100 µg/ml) bei unterschiedlichen Füllungsvolumina der Meßküvette.
Inkubationsbedingungen: T = 37° C; pH = 8,0; Zeit = 60 min

sichtlich. Die gewählte Reaktionszeit (4 min) ist unbedingt einzuhalten. Die Proben wurden 30 bis 90 Minuten nach der HCl-Zugabe im Fluorimeter gemessen.

Nachfolgend ist der Reaktionsablauf von der Umsetzung des synthetischen Substrates bis zur Bildung der fluoreszierenden Verbindung schematisch dargestellt (Abb. 12).

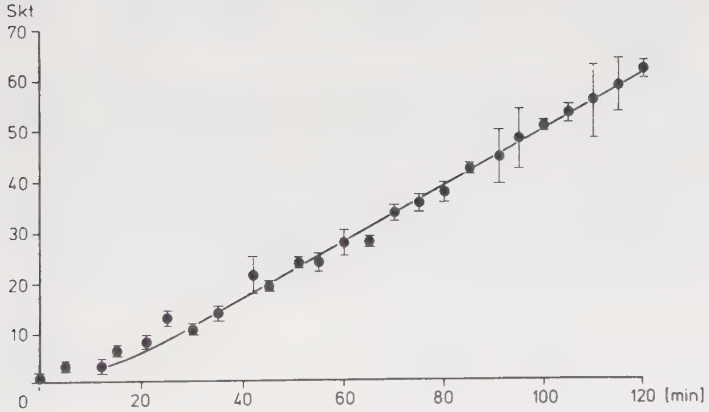

Abb. 10: Reaktionskinetische Messung der His-Leu-Bildung aus dem synthetischen Substrat Benzyloxycarbonyl-Phe-His-Leu (20 g/ml) und Nierenrinden-c.e. (20 µg/ml).
Inkubationsbedingungen: T = 37° C; pH = 6,0

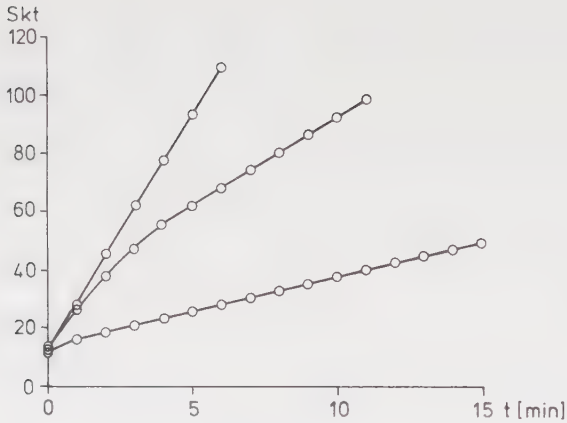

Abb. 11: Umsetzung des His-Leu und Phthaldialdehyd [100 µg/ml] bei 37° C, pH = 6,0, in Abhängigkeit von der Reaktionszeit bei x-verschiedenen Konzentrationen von His-Leu

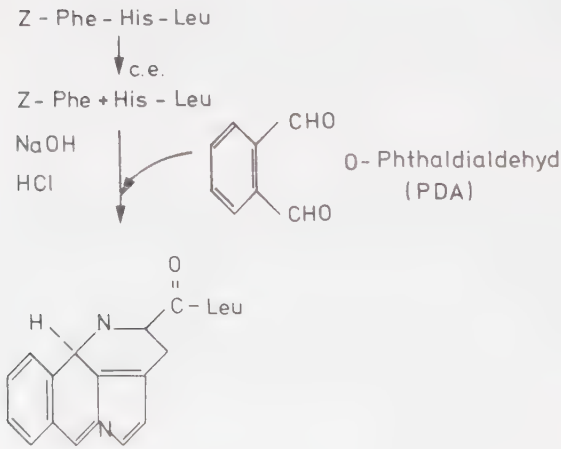

Abb. 12

II) Ergebnisse und Diskussion

a) Verteilung der c.e.-A. in verschiedenen Organen der Ratte:

Die höchsten c.e.-Aktivitäten wurden in weitgehender Übereinstimmung zu den Befunden von Cushman (17) im Nebenoden und Hoden nachgewiesen (Tabelle 3). Es wird vermutet, daß dieses Enzym auf die Spermiogenese und Motilität der Spermen einwirkt (17). D. und M. Roth wiesen c.e. auch in der menschlichen Samenflüssigkeit nach (71).

Tabelle 3: Verteilung der c.e.-A. in verschiedenen Geweben der Ratte gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat: Z-Phe-His-Leu (Z = Benzyloxycarbonyl); pH = 8.0

Gewebe	Skalenteile mit Standardabweichung (SE) (n = 4)
Hoden	92,00 ± 21,19
Zwerchfell	65,30 ± 3,60
Nebenhoden	63,20 ± 4,31
Lunge	56,30 ± 1,63
Milz	49,70 ± 15,33
Niere	40,70 ± 3,40
Oesophagus	39,71 ± 7,48
Pankreas	39,33 ± 0,82
Herz	37,70 ± 4,80
Leber	29,33 ± 3,60
Aorta	24,00 ± 11,14

Zur Klärung der Frage, ob das im Hoden enthaltene c.e. mit dem Plasma- bzw. Lungenenzym identisch ist, sind folgende Untersuchungen durchgeführt worden. Unter Verwendung der synthetischen Substrate Z-Phe-His-Leu und HHL wurde das pH-Optimum übereinstimmend bei pH 8,0 ermittelt, wie aus den Abb. 13 und 14 hervorgeht. Zur weiteren Charakterisierung des En-

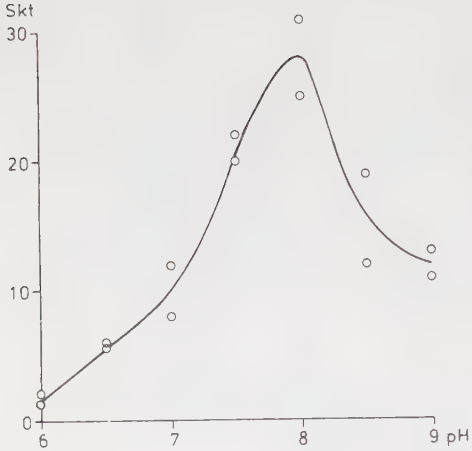

Abb. 13: pH-Abängigkeit der c.e.-A. von Hodenhomogenat [10 µg/ml] der Ratte. Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu [20 µg/ml]. Inkubationsbedingungen: T = 37° C, Zeit = 60 min

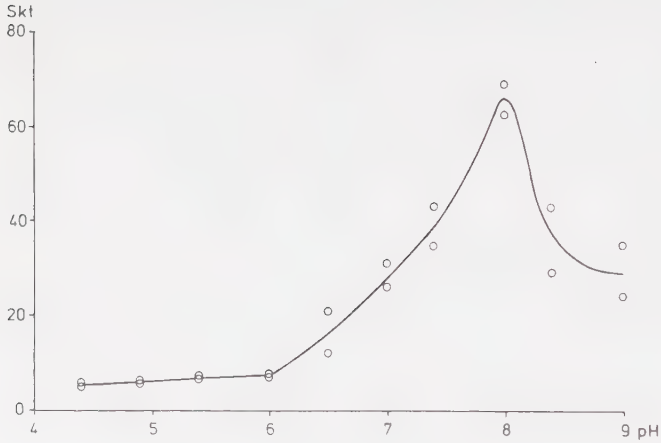

Abb. 14: pH-Abhängigkeit der c.e.-A. von Hodenhomogenat (10 µg/ml) der Ratte. Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Hip-His-Leu (20 µg/ml). Inkubationsbedingungen: T = 37° C; Zeit = 60 min

zyms wurde die Temperaturabhängigkeit gemessen und ein Temperaturoptimum bei etwa 37° C ermittelt (Abb. 15) und die Michaelis-Konstante (km) bestimmt. Hierfür wurde die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymsubstratkonzentration gemessen (Abb. 16) und mit Hilfe des von Lineweaver und Burk (50) beschriebenen Verfahrens als Michaelis-Menten-Konstante 36,9 ± 17,4 mol (n = 10) berechnet. Diese

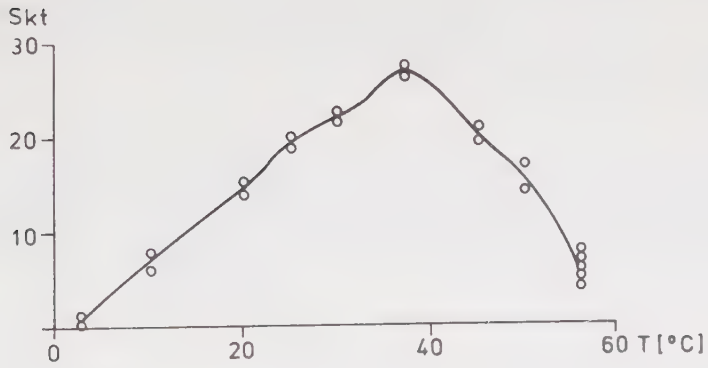

Abb. 15: Temperaturabhängigkeit der c.e.-A. von Hodenhomogenat (10 µg/ml) der Ratte. Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu (20 µg/ml). Inkubationsbedingungen: pH = 8,0; Zeit = 60 min

unterscheidet sich signifikant von der km des Plasmas und der anderer Organe. Daher ist anzunehmen, daß es sich bei dem c.e. des Hodens um ein Isoenzym handelt. Auch im Zwerchfell wurde eine relativ hohe c.e.-A. nachgewiesen, was be-

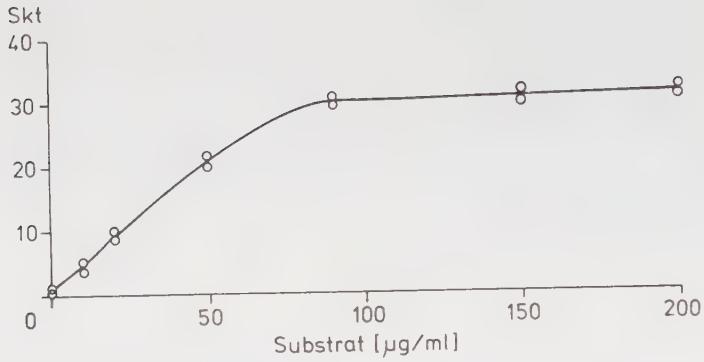

Abb. 16: Abhängigkeit der c.e.-A. (Hodenhomogenat [10 µg/ml] der Ratte) von der Enzymsubstratkonzentration. Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu.
Inkubationsbedingungen: T = 37° C; pH = 8,0; Zeit = 60 min

reits von Huggins und Thampi festgestellt worden war (39). Die Milz zeigte im Vergleich zu den Ergebnissen von Cushman eine höhere c.e.-A. (16). Oesophagus, Herz und Pankreas haben in etwa gleiche c.e.-Aktivitäten. Die Leber hatte in Übereinstimmung zu anderen Autoren (17, 70) nur einen geringen Enzymgehalt. Man nimmt daher an, daß das c.e. nicht vorwiegend in der Leber synthetisiert wird (60, 70), wie manche Autoren behaupten (51, 64). Die in der Aorta gemessene c.e.-A. entspricht der von Cushman (17) sowie von Aiken und Vane (1) ermittelten. Bumpus et al. (14) stellten dagegen in der Aorta die höchste c.e.-A, fest. Obwohl in Übereinstimmung zu anderen Autoren in der Niere nur eine geringe c.e.-A. gefunden wurde (17, 70), schließt dieses Ergebnis eine intrarenale

Funktion des RAS nicht aus, wie diese von verschiedenen Autoren angenommen wird (49, 90). Auch im Gehirn wurde c.e.-A. festgestellt. Die Ergebnisse von Yang et al. wurden damit bestätigt (98).

Ng und Vane berichteten erstmals über eine hohe c.e.-A. der Lunge (57, 58), was von anderen Autoren ebenfalls beschrieben wurde (5, 7, 9, 40, 79). Cushman et al. (16) haben das c.e. des Lungenhomogenats angereichert. Oparil zeigte, daß in der Lunge A I schnell zu A II konvertiert wird (60).

b) Lokalisation und Charakterisierung der Lungen-c.e.-Aktivität:

Um herauszufinden, in welchen Gewebsstrukturen der Lunge das c.e. lokalisiert ist, wurde die Enzymaktivität der Trachea, der Hauptbronchien sowie der Lungenspitze und der A. pulmonalis gemessen. Wie aus Abb. 17 hervorgeht, wurden in der Wandung der A. pulmonalis die höchsten Aktivitäten festgestellt (52,66 ± 4,53 Skt/µg FG), gefolgt von den Bronchien (32,4 ± 4,16 Skt/µg FG), der Lungenspitze (24,00 ± 1,20 Skt/µg FG) und der Trachea (16,0 ± 2,70 Skt/µg FG). Smith vermutet, daß das c.e. auf dem Endothel der Lungengefäße lokalisiert ist (76), da sonst die Konvertierung von A I bei der Lungenpassage nicht zu erklären wäre. Ryan et al. konnten das c.e. immunologisch auf den Endothelien der Lungengefäße nachweisen (73). Zur Charakterisierung des Lungen-c.e. wurde die pH-Abhängigkeit und die Michaelis-Menten-Konstante dieses Enzyms ermittelt. Als pH-Optimum wurde in Übereinstimmung zum Plasma- (Abb. 18) und Hoden-c.e. mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu etwa pH 8,0 ermittelt (Abb. 19). Die Michaelis-Menten-Konstante beträgt 86,4 ± 9,3 µmol (n = 4) und liegt damit in dem für das Plasma-c.e. ermittelten Bereich, während sich die Km-Werte für das Hoden- und Nierenenzym signifikant davon unterscheiden (Abb. 30).

Auf Grund des hohen c.e.-Gehaltes der Lunge vermutet man, daß hauptsächlich dieses Organ das im Plasma enthaltene A I

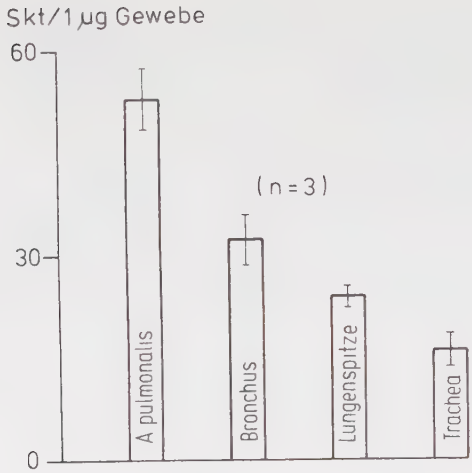

Abb. 17: Verteilung des c.e. in Strukturen der Lunge. Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu (100 µg/ml). Inkubationsbedingungen: T = 37° C; Inkubationszeit = 60 min; Inkubationsvolumen = 0,5 ml

konvertiert. Das in der Lunge gebildete A II ist sehr wahrscheinlich auch extrarenal (system. Kreislauf) wirksam. Ausserdem inaktiviert c.e. Bradykinin (62, 72), so daß das in der Lunge lokalisierte Enzym einer Bronchokonstriktion entgegenwirken könnte (2, 21, 41, 94-97).

c) Funktion und Lokalisation der renalen c.e.-A.:

Die Möglichkeit einer intrarenalen A II-Bildung wurde von Ng und Vane bezweifelt (6, 57, 58), da diese Autoren nach einer A I-Infusion in eine Nierenarterie keine entsprechende A II-Bildung im Nierenvenenblut nachweisen konnten. Eine Voraussetzung für diese Annahme ist jedoch, daß die Konver-

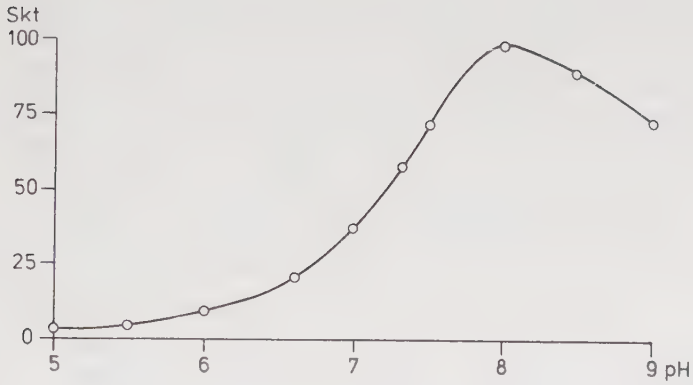

Abb. 18: pH-Abhängigkeit der c.e.-A. des Rattenplasmas (20 µl/ml). Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu (100 µg/ml).
Inkubationsbedingungen: T = 37° C; Inkubationszeit = 60 min; Inkubationsvolumen = 0,5 ml

tierung im Blut oder oberflächlich an den Gefäßwandungen stattfindet. Sollte jedoch die A II-Bildung extravasal im Bereich der juxtaglomerulären Apparate erfolgen, so ist es mit der von den Autoren angewandten Versuchsführung nicht möglich, die Angiotensinkonvertierung nachzuweisen.

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde festgestellt, daß in der Nierenrinde im Vergleich zu anderen Organen nur eine geringe c.e.-A. vorhanden ist (17, 70). Falls diese Enzymaktivität in einer bestimmten Struktur des Nephrons (z.B. dem JGA) konzentriert ist, sollte in diesem Bereich eine recht hohe Enzymaktivität vorhanden sein.

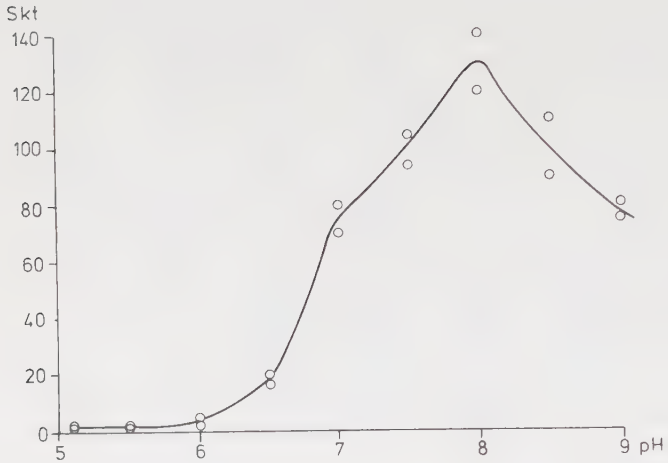

Abb. 19: pH-Abhängigkeit der c.e.-A. von Lungenhomogenat (10 µg/ml) der Ratte. Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu (20 µg/ml).
Inkubationsbedingungen: T = 37° C; Zeit = 60 min

Mit der Helmer'schen Aortenstreifen-Methode wurde eine Angiotensinkonvertierung in einzelnen mikrodissezierten JGA's in vitro nachgewiesen (29). Aus einem c.e.-freien Reninsubstrat wurde nach Zusatz von homogenisierten Glomeruli (mit JGA) A II freigesetzt. Da theoretisch A I auch mit Hilfe von Carboxypeptidasen durch Abspaltung der beiden Aminosäuren His und Leu vom C-terminalen Ende in A II umgewandelt werden kann, ist mit der Gefäßstreifen-Methode ein spezifischer Nachweis des c.e. nicht möglich, da das abgespaltene Dipeptid His-Leu nicht analytisch erfaßt wird.

Da heute bekannt ist, daß die Gefäßwandungen selbst c.e. enthalten, wird diese Methode von uns nicht mehr verwendet.

Zur Physiologie des intrarenalen RAS sind vornehmlich bei der intrarenalen Angiotensin-Konvertierung folgende Fragen noch offen:

1. Ist die in der Niere nachgewiesene c.e.-A. an spezielle Strukturen gebunden oder ubiquitär verteilt?
2. Ist das in der Niere enthaltene c.e. mit dem Lungen- bzw. Plasmaenzym identisch?
3. Liegt ein Isoenzym vor, so sind die optimalen Reaktionsbedingungen herauszufinden, da die Enzymaktivitäten sonst zu niedrig gemessen werden. Das würde die von anderen Autoren ermittelte geringe Nieren-c.e.-A. verständlich machen.
4. Ist das c.e. neben dem Renin an der Regulation der A II-Bildung beteiligt?

Diesen Fragestellungen wurde in der vorliegenden Arbeit besondere Aufmerksamkeit gewidmet.

Die Untersuchungen wurden an Rattennieren durchgeführt. Mit der von Piquilloud et al. für die Bestimmung des Plasma-c.e. angegebenen Methode (Substrat: Z-Phe-His-Leu) wurde im Nierenhomogenat nur eine geringe c.e.-A. nachgewiesen (s. Tabelle 3), was mit den Ergebnissen anderer Autoren übereinstimmt (6, 17). Zur Klärung der Identität des Nieren-c.e. mit dem Plasmaenzym wurde zunächst die pH-Abhängigkeit gemessen. Das pH-Optimum lag bei Verwendung der Substrate HHL oder Z-Phe-His-Leu bei 6,0 (Abb. 20 und 20), bei 6,5, wenn A I (Fa. SCHWARZ) als c.e.-Substrat benutzt wurde (Abb. 21). Die Nieren-c.e.-A. wurde daher in den folgenden Versuchen bei pH 6,0 gemessen. Bei pH 8,0, dem pH-Optimum des Lungen- bzw. Plasma-c.e., war die Enzymaktivität in jedem Fall weitaus niedriger, was die niedrigen von anderen Autoren ermit-

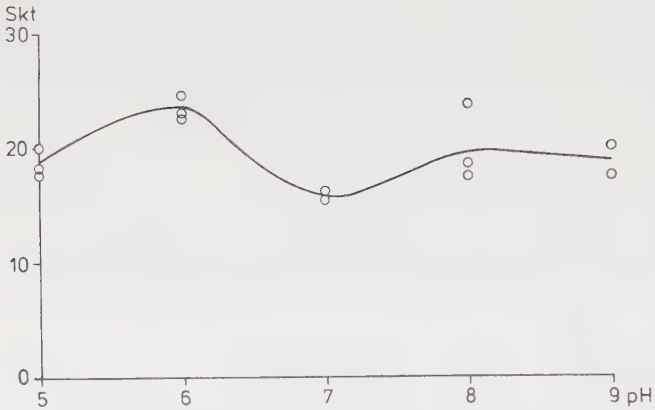

Abb. 20: pH-Abhängigkeit der c.e.-A. der Nierenrinde (100 µg/ml) der Ratte. Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Hip-His-Leu (20 µg/ml).
Inkubationsbedingungen: T = 37° C; Zeit = 60 min

telten Aktivitäten erklären könnte, die im pH-Bereich zwischen 7 und 8.5 gemessen wurden.

Zur weiteren Charakterisierung wurde das Blockierungsverhalten des Nierenrinden-c.e. untersucht. Die Ergebnisse sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

Die geringe Hemmung durch das Na-Salz des EDTA (Abb. 22) steht im Gegensatz zum Verhalten des c.e. anderer Herkunft, z.B. Lunge oder Plasma (17, 38, 68). Das von R. Boucher entdeckte "β"-c.e. ist ebenfalls nicht durch EDTA blockierbar (10, 12). Das β-c.e. wurde von Boucher hauptsächlich im Nierenmark nachgewiesen und ist durch DFP nicht hemmbar, so daß

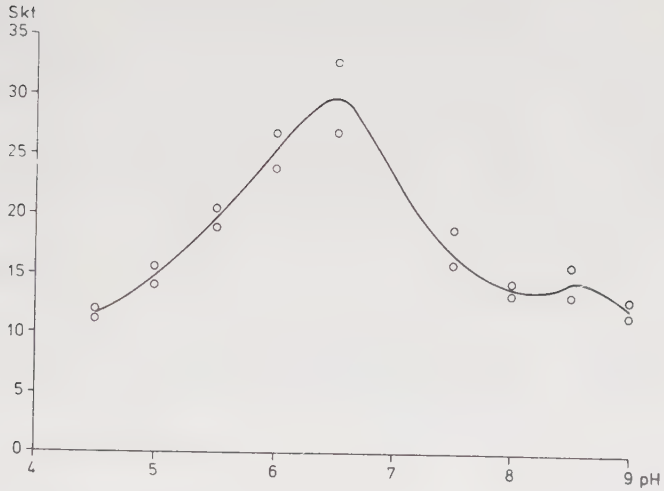

Abb. 21: pH-Abhängigkeit der c.e.-A. von Nierenrinde (100 µg/ml) der Ratte. Gemessen nach Piquilloud, Reinhard und Roth mit dem Substrat Angiotensin I (5 mg/ml).
Inkubationsbedingungen: T = 37° C; Zeit = 60 min

Tabelle 4:

Hemmsubstanz	Konzentration	Blockierung der Nierenrinden-c.e.A. in %
EDTA	1 mmol/l≙292,25 mg/l	12
DFP*	0,02 mg/ml	80
Hydroxychinolin	6,6 mg/ml	100
SQ 20 881	70 µg/ml	70

*DFP: Diisopropylfluorophosphat

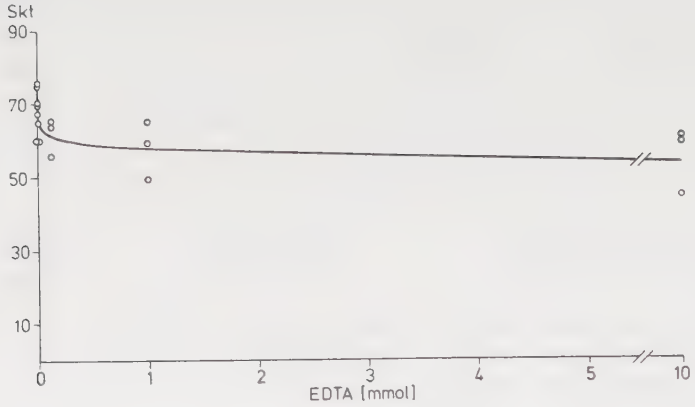

Abb. 22: Hemmung der c.e.-A. (Nierenrindenhomogenat [100 µg/ml] der Ratte) durch EDTA in verschiedenen Konzentrationen. Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu [100 µg/ml]. Inkubationsbedingungen: T = 37° C; pH = 6,0; Zeit = 60 min

wir eine Identität mit diesem Enzym ausschließen können. Der c.e.-Inhibitor SQ 20 881 (18,25) reduziert die c.e.-A. der Nierenrinde um ca. 70% (Abb. 23). Eine nahezu vollständige Inhibierung konnte durch Hydroxychinolin (Abb. 24) erreicht werden. Diese Substanz wurde untersucht, da sie als Hemmsubstanz beim radioimmunologischen Angiotensin I-Nachweis dient, bei dem Angiotensinase- und c.e.-A. vollständig ausgeschaltet werden muß. Auch DFP vermindert die c.e.-A. der Nierenrinde um ca. 80% (Abb. 25).

Das Nierenrinden-c.e. ist im Gegensatz zum Lungen- und Plasmaenzym jedoch in Übereinstimmung mit dem β-c.e. von der NaCl-Konzentration des Inkubationsmediums nahezu unabhängig (Abb. 26).

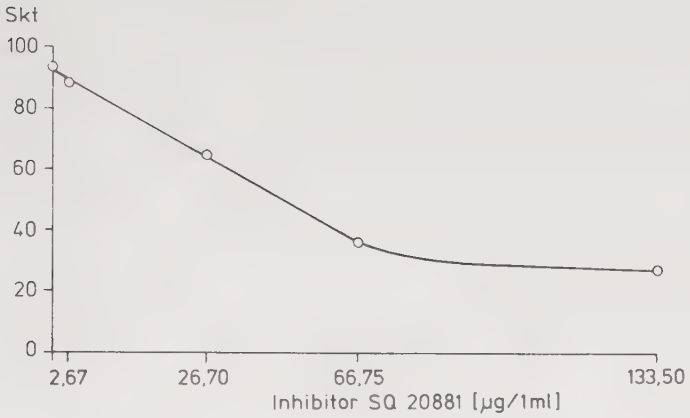

Abb. 23: Hemmung der c.e.-A. (Nierenrindenhomogenat [100 µg/ml] der Ratte) durch das Nonapeptid SQ 20 881 in verschiedenen Konzentrationen. Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu [100 µg/ml].
Inkubationsbedingungen: T = 37° C; pH = 8,0; Zeit = 60 min

Auf Grund des unterschiedlichen pH- und Blockierungsverhaltens sowie der Michaelis-Konstanten wird angenommen, daß das Nierenrinden-c.e. ein Isoenzym zu den in Plasma, Lunge oder Hoden vorkommenden Enzymen ist.

Das Nierenrinden-c.e. konnte mit Hilfe einer fraktionierten $(NH_4)_2SO_4$-Fällung im pH-Bereich zwischen 6,3 bis 7,1 angereichert werden. Als Ausgangsmaterial diente das Homogenat von etwa 160 Nieren etwa 3 Wochen salzreich (Standard-Altromin + 10% NaCl, physiologische Kochsalzlösung als Trinkflüssigkeit) ernährter männlicher Ratten. Die NaCl-reiche Diät wurde verabreicht, um die c.e.-A. dadurch zu erhöhen (3, 28).-

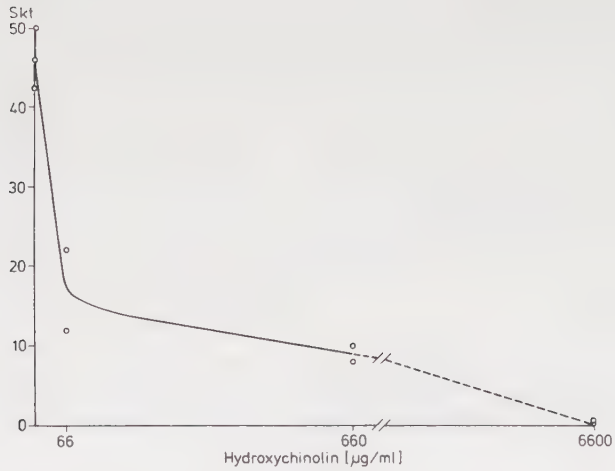

Abb. 24: Hemmung der c.e.-A. (Nierenrindenhomogenat) [100 µg/ml] der Ratte) mit Hydroxychinolin in verschiedenen Konzentrationen. Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu (100 µg/ml).
Inkubationsbedingungen: T = 37° C; pH = 6,0; Zeit = 60 min

Die Nierenrinde wurde vom Nierenmark abgetrennt, mechanisch zerkleinert und nach Zugabe von physiologischer Kochsalzlösung (ca. 1 ml/g Feuchtgewebe) nach Potter 3 min lang unterhalb 4° C homogenisiert. Die Abtrennung der Gewebsrückstände erfolgte mit einer MSE High Speed 18-Zentrifuge bei 10 000 g (30 min). Der Überstand wurde bei 180 000 g (30 min) zentrifugiert (BECKMANN, Ultrazentrifuge, L-2-Rotor Ti 50), die gelösten Proteine mit $(NH_4)_2SO_4$ fraktioniert präzipitiert und die Fällungen etwa 40 Stunden bei 4° C gegen mehrfach gewechseltes frisches Wasser dialysiert. Das Dialysat wurde zentrifugiert (10 000 g) und anschließend gefriergetrocknet.

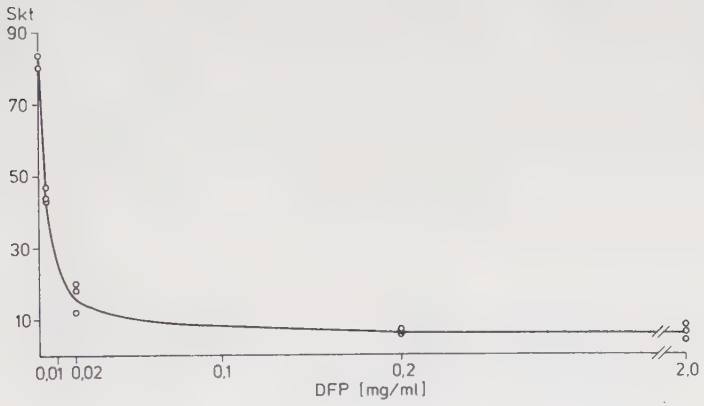

Abb. 25: Hemmung der c.e.-A. (Nierenrindenhomogenat [100 µg/ml] der Ratte) mit DFP (Diisopropylfluorophosphat) in verschiedenen Konzentrationen. Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu [100 µg/ml].

Inkubationsbedingungen: T = 37° C; pH = 6,0; Zeit = 60 min

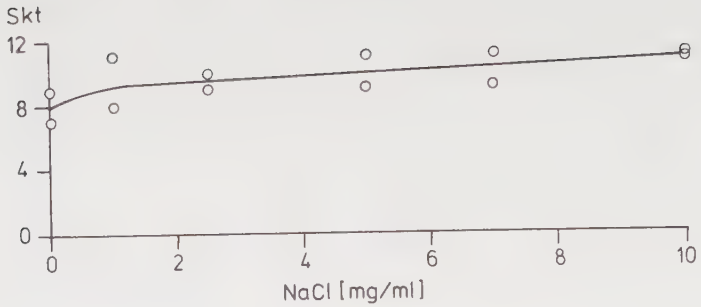

Abb. 26: Abhängigkeit der c.e.-A. (Nierenrindenhomogenat [20 µg/ml] der Ratte) von der NaCl-Konzentration des Inkubationsmediums. Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu [100 µg/ml].
Inkubationsbedingungen: T = 37° C; pH = 6,0; Inkubationszeit = 60 min; Inkubationsvolumen = 0,5 ml

Die Verteilung des c.e. auf die einzelnen Fraktionen ist der Abb. 27 zu entnehmen. In der 1. Fraktion konnte die höchste c.e.-A. ermittelt werden. Dieser Befund läßt vermuten, daß das Nierenrinden-c.e. ein hohes Molekulargewicht hat. Daneben wurde die Reninaktivität mit Hilfe des Angiotensin-Rattentests bestimmt (Abb. 27). Die höchste Reninaktivität war in der 4. Fraktion enthalten.

Die folgend beschriebenen Untersuchungen wurden zur Klärung der Funktion und Lokalisation des Nierenrinden-c.e. durchgeführt.

Die Abhängigkeit der Nierenrinden-c.e.-A. vom pH-Wert ist in der Abb. 28 wiedergegeben. Ein ausgeprägtes pH-Optimum wurde bei pH 6,0 festgestellt, ein oder zwei schwächer aus-

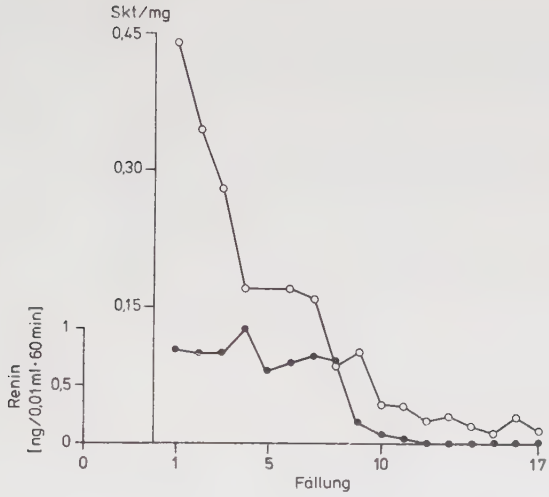

Abb. 27: Anreicherung des Nierenrinden-c.e. von NaCl-reich ernährten Ratten durch fraktionierte $(NH_4)_2SO_4$-Fällung und das Verhalten der Reninaktivität. Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu (100 µg/ml). Inkubationsbedingungen: T = 37° C; pH = 6,0; Inkubationsvolumen 0,5 ml; Inkubationszeit = 60 min

gebildete im pH-Bereich 7,5 bis 8,5. Zur Ermittlung der Nierenrinden-c.e.-A. wurde daher bei pH 6,0 inkubiert.

Die Nierenrinden-c.e.-A. konnte weitaus besser mit physiologischer Kochsalzlösung als mit bidestilliertem Wasser aus dem Nierenhomogenat extrahiert werden, wie aus der Abb. 29 hervorgeht. Unter gleichen Bedingungen wurde Nierenrindenhomogenat (1 g Gewebe/ml) der Ratte jeweils mit aqua bidest. oder mit 0,9%iger Kochsalzlösung 5 min geschüttelt und die

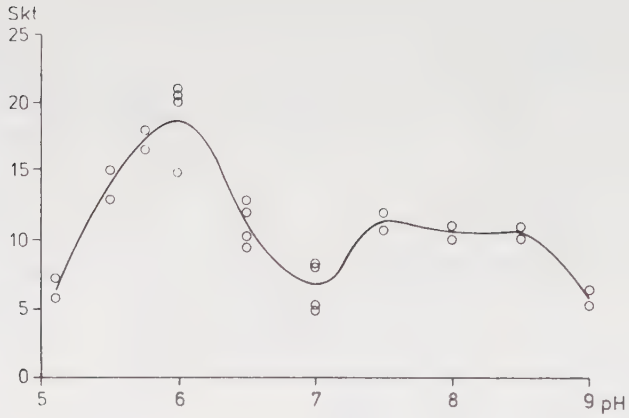

Abb. 28: pH-Abhängigkeit der Nierenrinden-c.e.-A. (10 µg/ml) der Ratte. Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu (20 µg/ml).
Inkubationsbedingungen: T = 37° C; Zeit = 60 min

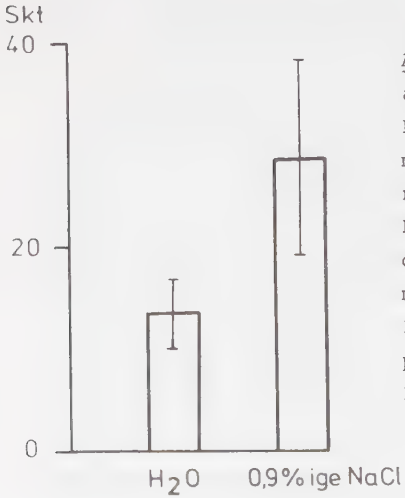

Abb. 29: Extraktion des c.e. mit aqua bidest. bzw. physiologischer Kochsalzlösung aus Nierenrindenhomogenat (20 µg/ml) NaCl-reich ernährter Ratten. Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu (100 µg/ml).
Inkubationsbedingungen: T = 37° C; pH = 6,0; Inkubationszeit = 60 min; Inkubationsvolumen = 0,5 ml

Gewebsrückstände durch Zentrifugation bei 10 000 g abgetrennt. Die mit physiologischer Kochsalzlösung extrahierte c.e.-A. betrug 28,5 ± 9,9 Skt (n = 4) und war über 2-fach höher als die im aqua bidest. (13,5 ± 2,3 Skt) (n = 4) enthaltene c.e.-A. Daher wurde in den folgenden Versuchen das Nierenrindengewebe in physiologischer Kochsalzlösung homogenisiert.

Zur Charakterisierung des Nierenrinden-c.e. und zur Klärung der Frage, ob dieses Enzym identisch mit denen anderer Organe ist, wurden die Michaelis-Menten-Konstanten (K_m) für die Reaktion mit dem synthetischen Substrat Z-Phe-His-Leu bestimmt. In Abb. 30 sind auch die Michaelis-Menten-Konstanten für das Lungen-c.e. aus 4 Messungen (86,5 ± 9,3 µmol) und für das Blutplasma (70,5 ± 19,6 µmol) angegeben. Da die Michaelis-Konstanten und das pH-Optimum für diese beiden c.e.-Präparationen etwa gleich groß sind (Abb. 18 und 19), sollten die Enzyme identisch sein.

Die von Cushman in den Nebenhoden und Hoden nachgewiesene c.e.-A. (16) ist wahrscheinlich auf ein Iso-c.e. zurückzuführen, da für dieses Enzym als K_m 36,9 ± 17,4 µmol (n = 7) bestimmt wurde. Die K_m für das c.e. der Nierenrinde beträgt 23,2 ± 7,4 µmol (n = 5) und unterscheidet sich signifikant von dem Lungen- oder Plasma-c.e. Wurde als Substrat synthetisches A I verwendet, betrug die K_m 154,54 ± 34,41 (n = 3). Das von uns in der Nierenrinde nachgewiesene Iso-c.e. ermöglicht die Annahme einer intrarenalen Funktion des RAS, die auf Grund der geringen bislang in der Niere nachgewiesenen c.e.-A. von verschiedenen Autoren bezweifelt wird (6, 57, 58).

Im Nierenmark-Homogenat konnte bei einem Inkubations-pH von 6,0 nur eine sehr geringe c.e.-A., im pH-Bereich von 8,5 dagegen eine etwas höhere nachgewiesen werden, was möglicherweise auf eine restliche Plasmaaktivität zurückzuführen ist (Abb. 31). In der Abb. 33 ist die pH-Abhängigkeit der im Nierenmark enthaltenen c.e.-A. dargestellt.

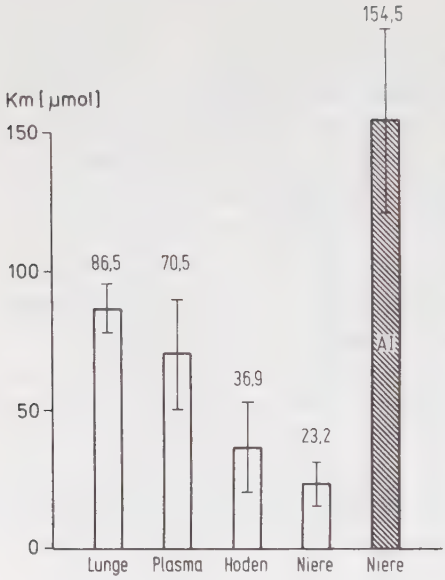

Abb. 30: Michaelis-Menten-Konstanten (K_m) für die Umsetzungen des c.e.-Substrates Z-Phe-His-Leu mit verschiedenen c.e.-Präparationen. Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth.

Inkubationsbedingungen: T = 37° C; pH = 8,0 (Niere = 6,0); Inkubationszeit = 60 min; Inkubationsvolumen = 0,5 ml

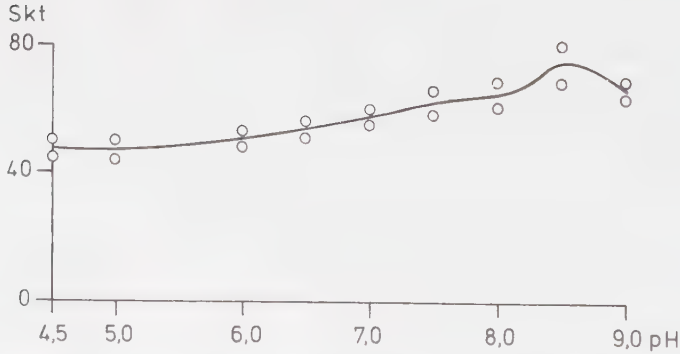

Abb. 31: pH-Abhängigkeit der im Nierenmark (10 µg/ml) der Ratte enthaltenen c.e.-A. Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu (20 µg/ml). Inkubationsbedingungen: T = 37° C; Zeit = 60 min; Inkubationsvolumen = 0,5 ml

Da in der Niere nur in der Rinde c.e. in höheren Aktivitäten nachweisbar ist, wurde die Verteilung des c.e. in folgend genannten Rindenstrukturen untersucht: Superfizielle und juxtamedulläre Glomeruli mit Gefäßpolen sowie Gewebeproben ohne Glomeruli und erkennbare Gefäße. Die Nierenarterien und Glomeruli wurden durch ein i.a. injiziertes, gefärbtes Silicon-Präparat (Mikrofil) dargestellt. Dazu wurden Wistar-Ratten mit ca. 150 g KG mit Inaktin (Fa.PROMONTA,Hbg.) 100 mg/kg KG i.p. narkotisiert und nach Tracheotomie Polyäthylenkatheter in die v. jugularis und in die a. carotis gelegt. In den mit einer Heparin enthaltenden physiologischen Kochsalzlösung gefüllten Carotis-Katheter erfolgte dann die Injektion von ca. 1 ml Mikrofil (Silicone rubber compound, CANTON BIOMEDICAL PRODUCTS, Inc., Boulder, Colorado, USA). Die Mikrofil-Mischung bestand aus 0,4 ml "MV-122 Yellow" und 0,6 ml "MV diluent" mit 0,03 ml "curringt agent".

Die durch einen Flankenschnitt freigelegte Niere wurde sofort entfernt, wenn das farbige Ausgußmaterial an der Nierenoberfläche sichtbar wurde. Die Nieren wurden dann 10 Minuten in flüssigen Stickstoff eingetaucht und anschließend unterhalb 0° C gefriergetrocknet. Die oben angegebenen Strukturen wurden unter einem Stereomikroskop (BAUSCH & LOMB) bei ca. 100-facher Vergrößerung unterhalb 4° C aus 0,5 - 1,0 mm dicken Nierenschnitten mit feinen Nadeln mikrodisseziert. Es wurde darauf geachtet, daß der Gefäßpol, bestehend aus vas afferens und efferens, am Glomerulus verblieb. Es war bislang nicht möglich, die Bowman'schen Kapseln vollständig frei von kleinen Resten benachbarter Strukturen zu isolieren.

Zur chemischen Charakterisierung des im Bereich der Glomeruli lokalisierten c.e. wurden 350 Glomeruli (mit Gefäßpolen) einer mit Mikrofil gefüllten Rattenniere mikrodisseziert und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Ultraschall (3 x 5 sec) aufgeschlossen. Die homogenisierten Glomeruli wurden mit einer Eppendorf-Zentrifuge 2 Minuten bei ca. 500 g abgetrennt. Die c.e.-A. war im Überstand enthalten.

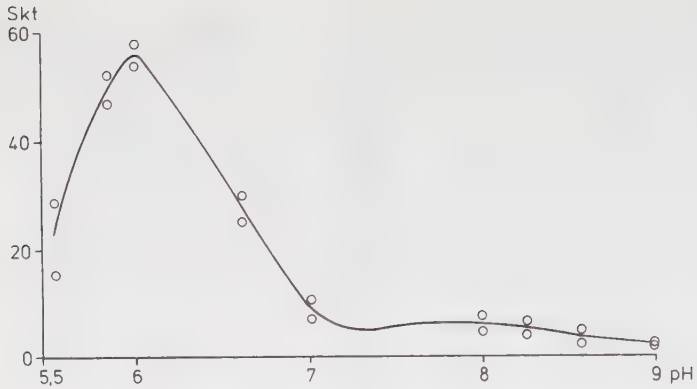

Abb. 32: pH-Abhängigkeit der c.e.-A. von mikrodissezierten Glomeruli mit Gefäßpolen (350/0,5 ml). Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu [100 µg/ml].
Inkubationsbedingungen: T = 37° C; Zeit = 195 min; Inkubationslösung = 0,5 ml

Abb. 32 zeigt die pH-Abhängigkeit der aus den mikrodissezierten Glomeruli extrahierten c.e.-A. Das pH-Optimum liegt bei pH 6,0 und stimmt mit dem des Nierenrindenhomogenats (Abb. 28) und dem der isolierten Tubuli (33, 34) (Abb. 33) überein. Da aus funktionellen Gründen die superfiziellen Glomeruli von den juxtamedullären unterschieden werden - wobei eine Beteiligung des RAS zur Diskussion steht - wurde die c.e.-A. in beiden Strukturen und außerdem in dem Mikrofil-freien Nierenrindengewebe gemessen. Das farblose Material bestand hauptsächlich aus Tubuli und Bindegewebe. Bislang ließen sich die peritubulären Kapillaren durch Mikrofil nicht darstellen, so daß diese möglicherweise noch in der Präparation enthalten sind.

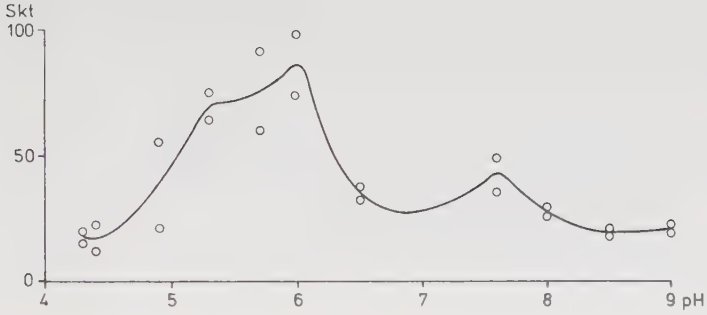

Abb. 33: pH-Abhängigkeit der c.e.-A. mit Kollagenase isolierter Tubuli (10 µg/ml) der Ratte. Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu (20 µg/ml).
Inkubationsbedingungen: T = 37° C; Zeit = 60 min; Inkubationsvolumen = 0,5 ml

Die höchste c.e.-A. (Abb. 34) wurde für die isolierten Tubuli ermittelt (0,097 ± 0,027 Skt/µg, n = 3). Darauf folgte die der juxtamedullären Glomeruli (incl. Gefäßpole) (0,077 ± 0,033 Skt/µg, n = 3) und dann erst die der oberflächlichen Glomeruli (0,070 ± 0,025 Skt/µg, n = 3). Diese Befunde legen die Annahme nahe, daß das c.e. im Bereich der Tubuli, jedoch nicht in den JGA, synthetisiert wird. Falls eine ausreichende Konzentration des natürlichen c.e.-Substrates A I vorhanden ist, wird eine A II-Bildung in diesen Strukturen besonders begünstigt. Damit wird die Theorie unterstützt, nach der A II im distalen und proximalen Tubulus die Na-Resorption hemmen soll. Ochwadt et al. postulierten auf Grund von Mikropunktionsversuchen, daß in die peritubulären Kapillaren mikroinfundiertes A II den Na-Transport im distalen

Tubulus inhibiert (58). Am proximalen Tubulus konnte von dieser Arbeitsgruppe keine Beeinflussung der Na-Resorption festgestellt werden. Dagegen fanden Steven und Mitarbeiter auch im proximalen Tubulus eine Verminderung des Na-Transportes (80).

Mit dem folgenden Versuch sollte geklärt werden, ob die c.e.-A. der Glomeruli vom NaCl-Gehalt der Nahrung beeinflußt wird. Es wurde das Verhalten der c.e.-A. von normal, salzreich und salzarm ernährten Ratten untersucht. Dazu wurden

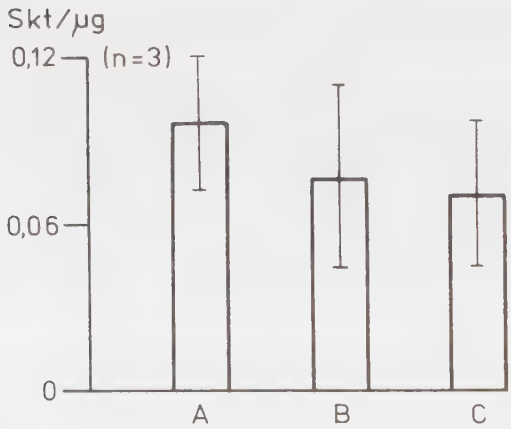

Abb. 34: Verteilung der c.e.-A. A) Ca. 10 µg oberflächliches Nierenrindengewebe ohne Glomeruli und erkennbare Gefäße; B) 10 juxtamedulläre Glomeruli incl. JGAs; C) 10 superfizielle Glomeruli incl. JGAs der Ratte. Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu (100 g/ml). Inkubationsbedingungen: T = 37° C; pH = 6,0; Inkubationszeit = 60 min; Inkubationsvolumen = 0,5 ml

in getrennten Käfigen je zwei männliche, 3 Wochen alte Wistar-Ratten eines Wurfes verwendet. Als normales Futter wurde das Na-arme Altrominmehl (Fa. ALTROMIN, Lage/Lippe, C 1036) verfüttert, dem 1% NaCl zugesetzt worden war. Als Trinkflüssigkeit diente Leitungswasser. Zur salzarmen Diät wurde neben dem Na-armen Altrominmehl aqua dest. zum Trinken gegeben. Die salzreiche Ernährung bestand aus 90% Altromin (C 1036) + 10% NaCl sowie physiologischer Kochsalzlösung. Während des Versuches wurde die c.e.-A. im Rattenurin gemessen. Wie die Abb. 35 zeigt, war die Enzymaktivität im Urin der salzreich ernährten Ratten während der gesamten Versuchsdauer niedriger als bei den salzarm ernährten Tieren.

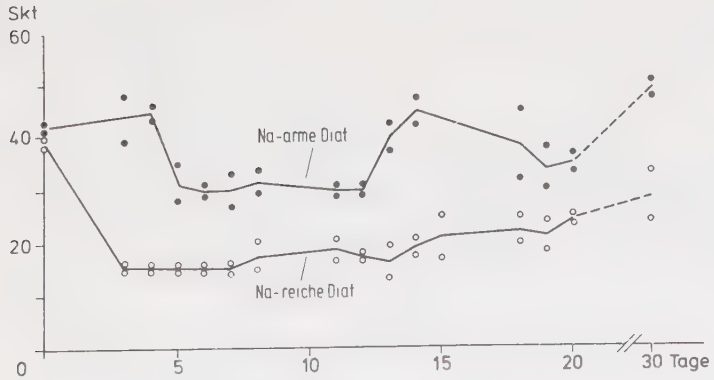

Abb. 35: C.e.-A. im Rattenurin nach salzreicher und salzarmer Diät. Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu (100 µg/ml).
Inkubationsbedingungen: T = 37° C; pH = 6,0; Inkubationszeit = 60 min; Inkubationsvolumen = 0,5 ml

Nach 4 Wochen wurden die Ratten getötet, die Nieren nach dem oben beschriebenen Verfahren behandelt und die in den Glomeruli enthaltene c.e.-A. gemessen. Die Ergebnisse sind den Tabellen 5, 6 und 7 zu entnehmen. Die Enzymaktivität war bei den salzreich ernährten Tieren (Abb. 36) im Vergleich zu den salzarm ernährten (Abb. 37) höher. Die höchste c.e.-A. wurde in den Glomeruli bestimmt, die von normal ernährten Ratten stammten (Abb. 38).

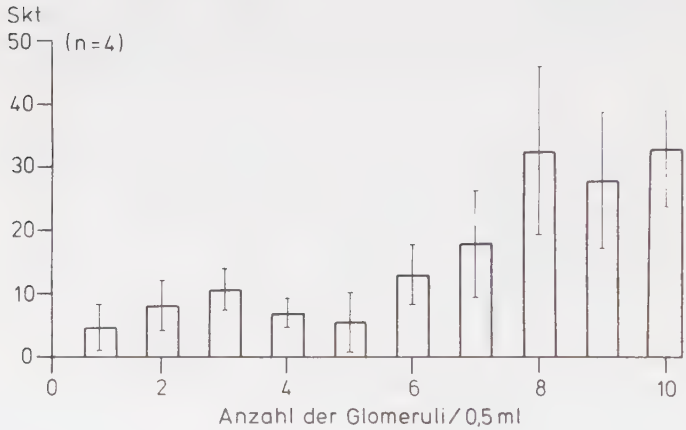

Abb. 36: C.e.-A. in 1 - 10 mikrodissezierten Glomeruli (incl. Vasa afferens) NaCl-reich ernährter Ratten (4 Wochen Altromin-Futter C 1036 + 10% NaCl, Trinkflüssigkeit: physiol. Kochsalzlösung). Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu (100 µg/ml).
Inkubationsbedingungen: T = 37° C; pH = 6,0; Inkubationszeit = 60 min; Inkubationsvolumen = 0,5 ml

Tabelle 5: C.e.-A. in mikrodissezierten JGAs nach salzreicher Diät (n = 4)

Anzahl der JGAs	c.e.-A. mit Standardabweichung (Skt/0,5 ml·60 min)
1	4,00 ± 3,58
2	8,25 ± 4,03
3	10,50 ± 3,53
4	6,75 ± 2,52
5	5,25 ± 5,06
6	12,75 ± 4,48
7	18,25 ± 8,34
8	32,50 ± 13,09
9	28,00 ± 11,34
10	33,13 ± 9,00

Da im Mittel jeder Glomerulus eine gleichgroße c.e.-A. enthalten sollte, müßten bei einer Auftragung der c.e.-A. in Abhängigkeit von der Anzahl der Glomeruli die ermittelten Werte um eine Gerade streuen, was jedoch nicht der Fall ist. Zur Klärung dieses Phänomens sind weitere Untersuchungen erforderlich. Möglicherweise ist in den mikrodissezierten Gewebspartikeln ein Inhibitor enthalten, der das c.e. in Abhängigkeit von seiner Konzentration hemmen kann. Daher ist die Bestimmung der c.e.-A. in einzelnen Glomeruli nur unter Vorbehalt möglich (Abb. 39). Bei normaler Diät fanden sich höhere c.e.-A. in den superfiziellen Glomeruli (14,7 ± 0,6 Skt, n = 15) im Vergleich zu den juxtamedullären (13,3 ± 0,5 Skt, n = 15). Dagegen wurde die höchste c.e.-A. nach salzreicher Diät in den juxtamedullären Glomeruli (18,7 ± 5,4 Skt, n = 10) gemessen, etwas geringere Aktivitäten waren in den oberflächlichen (16,8 ± 5,8 Skt, n = 10) enthalten. Die niedrigsten c.e.-A. wurden nach salzarmer Diät ermittelt (superfiziell: 10,2 ± 4,0 Skt, n = 8; juxtamedullär: 11,6 ± 3,2 Skt, n = 8).

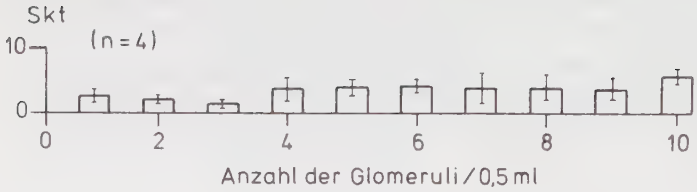

Abb. 37: C.e.-A. in 1 - 10 mikrodissezierten Glomeruli (incl. Vasa afferens) NaCl-arm ernährter Ratten (4 Wochen Altromin-Futter C 1036, Trinkflüssigkeit: aqua dest.). Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu (100 µg/ml; n = 4).
Inkubationsbedingungen: T = 37° C; pH = 6,0; Inkubationszeit = 60 min; Inkubationsvolumen = 0,5 ml

Tabelle 6: C.e.-A. in mikrodissezierten JGAs nach salzarmer Diät (n = 4)

Anzahl der JGAs	c.e.-A. mit Standardabweichung (Skt/0,5 ml·60 min)
1	2,51 ± 1,01
2	2,25 ± 0,53
3	1,50 ± 0,49
4	3,52 ± 1,75
5	4,01 ± 1,25
6	4,45 ± 1,02
7	3,75 ± 2,12
8	3,70 ± 2,15
9	3,69 ± 1,75
10	5,50 ± 1,25

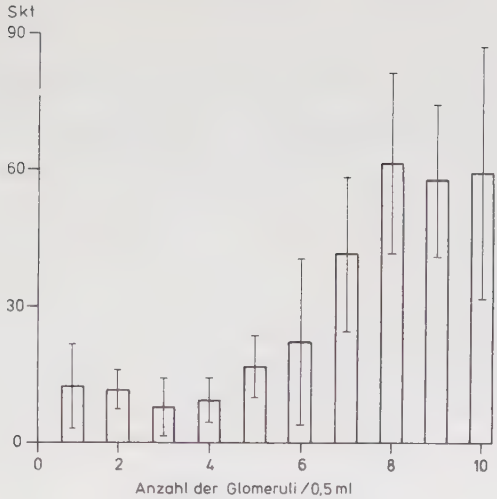

Abb. 38: C.e.-A. in 1 - 10 mikrodissezierten Glomeruli (incl. Vasa afferens) von normal ernährten Ratten (4 Wochen Altromin-Futter C 1036 + 1% NaCl, Trinkflüssigkeit: Leitungswasser). Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu (100 µg/ml; n = 6).
Inkubationsbedingungen: T = 37° C; pH = 6,0; Inkubationszeit = 60 min; Inkubationsvolumen = 0,5 ml

Tabelle 7: C.e.-A. in mikrodissezierten JGAs (n = 4)

Anzahl der JGAs	c.e.-A. mit Standardabweichung (Skt/0,5 ml·60 min)
1	12,33 ± 9,45
2	11,66 ± 5,22
3	8,33 ± 6,47
4	9,66 ± 4,49
5	16,83 ± 6,90
6	22,33 ± 19,18
7	42,00 ± 17,43
8	62,17 ± 20,31
9	58,33 ± 16,94
10	60,50 ± 28,65

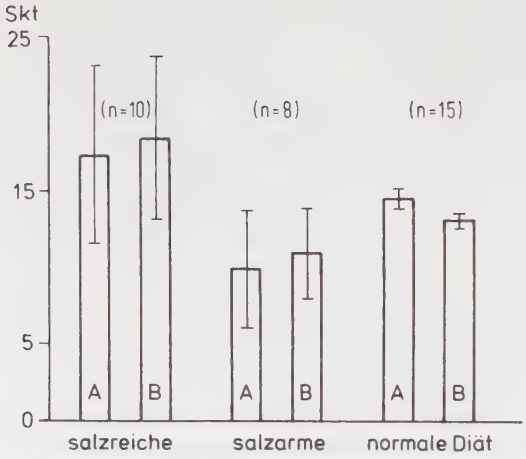

Abb. 39: C.e.-A. in einzelnen superfiziellen und juxtamedullären Glomeruli der Rattenniere nach salzreicher (n = 10), salzarmer (n = 8) und normaler (n = 15) Diät. Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu (100 µg/ml).
Inkubationsbedingungen: T = 37° C; pH = 6,0; Inkubationszeit = 60 min; Inkubationsvolumen = 0,5 ml.
A = superfiziell; B = juxtamedullär

d) Verhalten der c.e.-A. nach Renin-Stimulierung:

α) C.e.-A. nach temporärer Abklemmung einer Nierenarterie:

Es wurden 150 - 200 g schwere weibliche Wistar-Ratten mit 100 mg Inaktin/kg KG i.p. narkotisiert, Trachea sowie a. carotis und v. jugularis katheterisiert und die linke Niere durch einen medianen Bauchschnitt freigelegt. Die linke a. renalis wurde in der Nähe des Nierenbeckens etwa 10 Minuten nach der Präparation mit einer feinen Pinzette 30 - 60 Minuten abgeklemmt. Zur Enzymbestimmung entnahmen wir aus der a. carotis mit einem Katheter ca. 100 µl Blut, das in heparinisierten Eppendorf-Reaktionsgefäßen (3810) gesammelt und möglichst schnell bei ca. 500 g ($\leq 4^{o}$ C, 2 min) zentrifugiert wurde. Der Blutverlust wurde durch eine gleichzeitig erfolgende Infusion einer physiologischen Kochsalzlösung in die v. jugularis kompensiert. Wie aus der Abb. 40 und Tabelle 8 ersichtlich, steigt die c.e.-A. nach dem Abklemmen sofort um mehr als das Dreifache von 30,00 ± 4,98 Skt auf 94,00 ± 8,01 Skt (n = 4) an. Die Ischämie dauerte 30 Minuten, darauf wurde die Nierendurchblutung wieder freigegeben, worauf sich die c.e.-A. nach 5 Minuten auf 75,00 ± 2,85 Skt verminderte. Dieser Versuch wurde nochmals wiederholt. Abb. 41 und Tabelle 9 zeigen ein ähnliches Verhalten der c.e.-A. Nach Abklemmung der Nierenarterie (45 min) erhöhte sich die Plasma-c.e.-A. von 27,5 ± 1,95 Skt auf 70 ± 3,30 Skt. 40 Minuten nach Wiedereinsetzen der Durchblutung wurde eine Plasma-c.e.-A. von 85,1 ± 3,4 Skt gemessen. In beiden Versuchen zeigte sich bei einem Inkubations-pH von 6,0 nur eine geringere Veränderung der c.e.-A., was darauf schließen läßt, daß das möglicherweise im Plasma enthaltene Iso-c.e. der Nierenrinde nicht beteiligt ist. Die mittlere c.e.-A. in den superfiziellen Glomeruli der abgeklemmten (linken) Niere betrug 46,25 ± 7,35 Skt/10 Glomeruli (n = 4), in der gesunden (rechten) Niere 27,00 ± 16,06 Skt/10 Glomeruli (n = 4). Der Quotient der abgeklemmten zur gesunden Niere ergab 1,71. Die c.e.-A. ein-

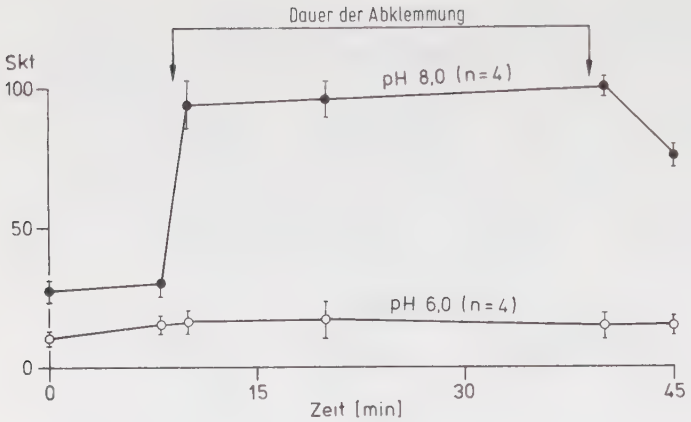

Abb. 40: Plasma-c.e.-A. vor und nach Abklemmen der linken Nierenarterie (n = 4). Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu (100 µg/ml).
Inkubationsbedingungen: T = 37° C; pH = 6,0 und 8,0; Inkubationszeit = 60 min; Inkubationsvolumen = 0,5 ml

Tabelle 8: Plasma-c.e.-A. vor, während und nach Abklemmen der linken a. renalis (n = 4)

Zeit (min)	c.e.-A. bei pH 6,0 (Skt/0,5 ml·60 min)	c.e.-A. bei pH 8,0 (Skt/0,5 ml·60 min)
0	11 ± 1,98	27 ± 2,89
8	15 ± 2,33	30 ± 4,98
16	16 ± 2,89	94 ± 8,01
20	17 ± 5,01	97 ± 5,11
40	15 ± 3,11	100 ± 2,33
45	14 ± 2,66	75 ± 2,85

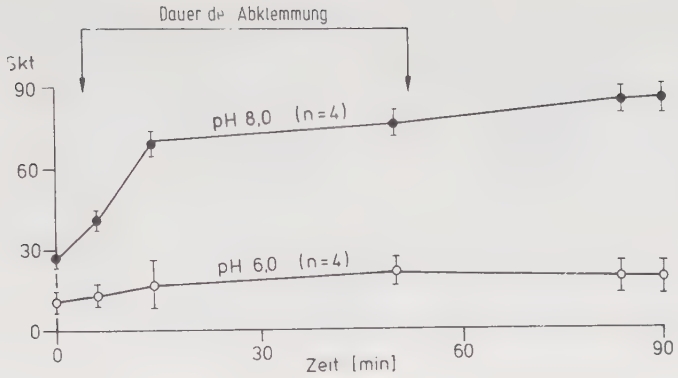

Abb. 41: C.e.-A. im Blutplasma (20 µl/ml) während Abklemmung der a. renalis und anschließender Wiederdurchblutung der Niere. Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu (100 µg/ml).
Inkubationsbedingungen: T = 37° C; pH = 8,0 bzw. 6,0; Inkubationszeit = 60 min; Inkubationsvolumen = 0,5 ml

Tabelle 9: Plasma c.e.-A. vor, während und nach Abklemmen der linken a. renalis (n = 4)

Zeit (min)	c.e.-A. bei pH 6,0 (Skt/0,5 ml·60 min)	c.e.-A. bei pH 8,0 (Skt/0,5 ml·60 min)
0	12,00 ± 2,01	27,50 ± 1,95
6	13,25 ± 1,89	40,33 ± 2,12
14	17,00 ± 6,05	70,00 ± 3,30
50	21,50 ± 3,75	76,00 ± 3,46
84	19,50 ± 4,85	85,00 ± 3,32
90	19,60 ± 4,01	85,10 ± 3,40

zelner Glomeruli war in der abgeklemmten Niere 14,00 ± 6,63 Skt (n = 9) und in der gesunden 7,33 ± 3,89 Skt (n = 9). Der Quotient betrug 1,91 (Abb. 42). Auch die JGA-Reninaktivitäten der abgeklemmten sowie der kontralateralen Niere wurden bestimmt. Abb. 43 zeigt, daß der JGA-Reningehalt in der ischämischen Niere 9,19 ± 4,70 ng/0,05 ml · 60 min höher als in der kontralateralen 5,98 ± 2,77 ng/0,05 ml · 60 min war. Der Quotient der JGA-Reninaktivitäten (abgeklemmte zur gesunden Niere) betrug 1,54 ng/0,05 ml · 60 min. Diese Versuche wurden wiederholt. Die mittlere c.e.-A. einzelner

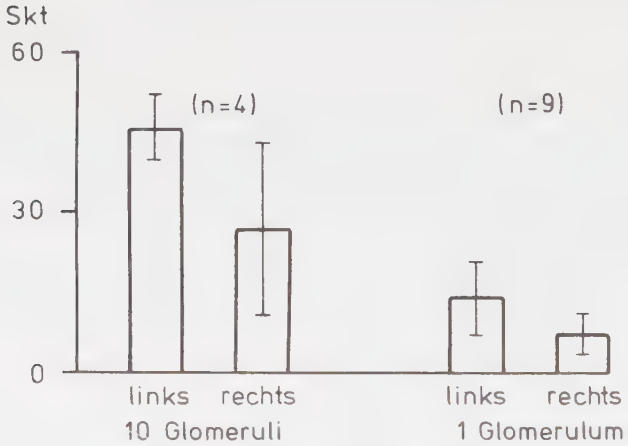

Abb. 42: C.e.-A. von 10 (n = 4) bzw. 1 (n = 9) mikrodissezierten Glomeruli nach Abklemmung der linken Niere (48 min). Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu (100 µg/ml). Inkubationsbedingungen: T = 37° C; pH = 6,0; Inkubationszeit = 60 min; Inkubationsvolumen = 0,5 ml

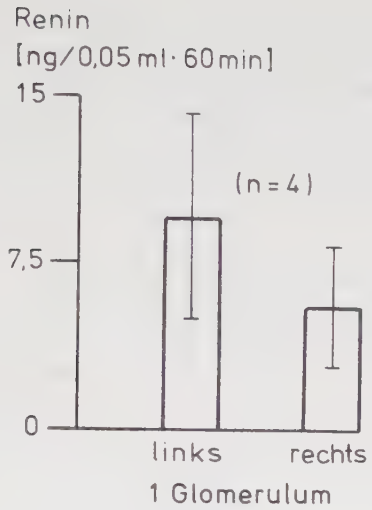

Abb. 43: Reninaktivität von einzelnen (n = 10) mikrodissezierten Glomeruli nach Abklemmung der linken Nierenarterie (48 min)

Glomeruli (Tabelle 10) betrug 17,8 ± 7,22 Skt (n = 39) in der 60 Minuten lang abgeklemmten Niere und 9,4 ± 4,99 Skt in der kontralateralen Niere (n = 40). Der Quotient aus den c.e.-A. der ischämischen zur kontralateralen Niere ergab 2,02 (n = 4). Die Reninaktivitäten waren in der abgeklemmten Niere 24,82 ± 12,64 ng/0,1 ml · 60 min (n = 38) und in der gesunden 0,54 ± 0,86 ng/0,1 ml · 60 min (n = 38) (Tabelle 10).

Auch die JGA-Angiotensinaseaktivität wurde durch die Ermittlung der Halbwertszeit ($T_{1/2}$) des Enzymsubstrates Hypertensin-Ciba bestimmt (19). $T_{1/2}$ der abgeklemmten Niere betrug 105,3 ± 16,2 min (n = 3), die der kontralateralen 36,3 ± 8,0 min (n = 3). In der abgeklemmten Niere konnte eine fast 3-fach geringere JGA-Angiotensinaseaktivität gemessen werden, was mit früheren Befunden unserer Arbeitsgruppe übereinstimmt.

Tabelle 10: C.e.-A. und Reninaktivität nach Abklemmen der a. renalis, gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu (100 µg/ml) bei T = 37° C, pH = 6,0, Inkubationszeit 60 min, Inkubationsvolumen 0,5 ml

	abgeklemmte Niere		gesunde Niere		Quotient c.e.	Quotient Renin
Nr.	C.e.-A. (Skt)	Renin-A. (ng/0,1 ml·60 min)	C.e.-A. (Skt)	Renin-A. (ng/0,1 ml·60 min)	abgekl. Niere / gesunde Niere	abgekl. Niere / gesunde Niere
1	14,8	23,99	6,4	0,08	2,31	299,86
2	20,9	40,26	11,6	0,02	1,80	2013,00
3	25,8	25,70	15,3	0,24	1,69	107,08
4	9,7	9,35	4,3	1,82	2,26	5,14

Bei experimenteller Ischämie der Niere wurde die c.e.-A. der Glomeruli um ca. 100% erhöht, die Reninaktivität in der geschädigten Niere ebenfalls gesteigert und der JGA-Angiotensinasegehalt deutlich vermindert. Jede dieser drei Veränderungen führt zu einer Erhöhung der A II-Aktivität, da die A I- und A II-Bildung beschleunigt und der Angiotensinabbau verlangsamt wird.

β) C.e.-A. bei experimenteller Hämorrhagie:

Mit Inaktin (100 mg/kg KG i.p.) narkotisierten Ratten wurde ein Arterienkatheter gelegt, der der kontinuierlichen Registrierung des Blutdruckes diente. Nach einer Anpassungsperiode von 30 Minuten wurde aus dem Katheter in zeitlichen Abständen von 15 - 30 Minuten ca. 100 µl Blut abgenommen, das 2 Minuten bei 500 g zentrifugiert und in dem anschliessend die c.e.-A . bestimmt wurde. Die Proben wurden bei pH 8,0 mit dem synthetischen Substrat Z-Phe-His-Leu bei 37° C inkubiert. Aus Abb. 44 ist ersichtlich, daß sich die Plasma-c.e.-A. etwa verdoppelte, von 23 ± 3,6 Skt bis auf 42 ± 2,5 Skt. Diese Befunde zeigen, daß im Plasma das c.e. während des Entblutens parallel zum Renin ansteigt, wodurch eine stärkere A II-Bildung resultiert, als durch die Erhöhung der Reninaktivität allein zu erwarten wäre.

Tabelle 11: Plasma-c.e.-A. und arterieller Blutdruck nach experimenteller Hämorrhagie der Ratte (n = 4)

Zeit (min)	Plasma-c.e.-A. (Skt/0,5 ml·60 min)	Blutdruck (mm Hg)
0	23 ± 3,61	128
15	28 ± 2,30	110
45	30 ± 2,08	115
75	29 ± 2,31	128
225	42 ± 2,45	100 (Tod der Ratte)

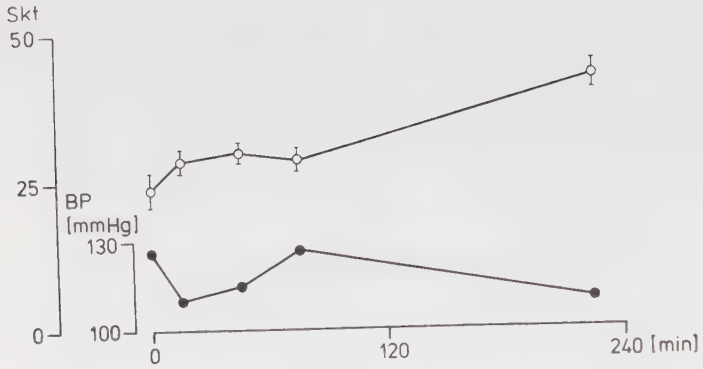

Abb. 44: Plasma-c.e.-A. und arterieller Blutdruck BP (a. carotis) der Ratte nach experimenteller Hämorrhagie. Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu (100 µg/ml). Inkubationsbedingungen: T = 37° C; pH = 8,0; Inkubationszeit = 60 min; Inkubationsvolumen = 0,5 ml

e) Bestimmung der Plasma-c.e.-A. bei Gesunden und Kranken:

In den letzten Jahren wurde in zunehmendem Maße bei Hypertonikern die Plasma-Reninaktivität (PRA) bestimmt. Da in vielen Fällen Bluthochdruck und PRA bzw. Plasma-Angiotensin II-Aktivität korreliert sind, liegt die Annahme nahe, daß die Hypertonie eine direkte Folge des erhöhten Plasma-A II-Spiegels ist. Allerdings gibt es auch gegenteilige Befunde, z.B. kann trotz erhöhter Reninaktivität der systemische Blutdruck im Normbereich liegen.

Mit Hilfe salzarmer Nahrung (4) oder bestimmter Diuretika (z.B. Furosemid) ist es möglich, bei Hypertonikern den Blutdruck zu senken, obwohl die PRA dadurch noch erhöht wird.

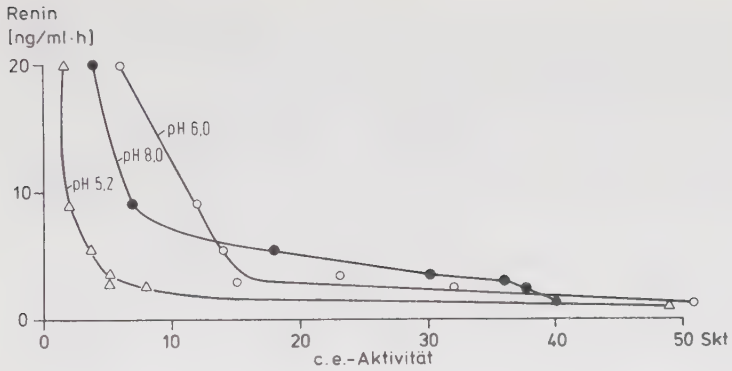

Abb. 45: C.e.-A. im menschlichen Plasma (20 µg/ml) bei verschiedenen pH-Werten. Gemessen nach Piquilloud, Reinharz und Roth mit dem Substrat Z-Phe-His-Leu (100 µg/ml).
Inkubationsbedingungen: T = 37° C; Zeit = 60 min; Inkubationsvolumen = 0,5 ml

Obwohl die blutdruckwirksame Komponente des RAS das A II ist, das aus dem Dekapeptid A I erst mit Hilfe des c.e. gebildet wird, wurde die Mitwirkung des c.e. an der A II-Bildung bislang wenig beachtet. Das lag wahrscheinlich daran, da] die quantitative Messung der c.e.-A. bisher nur in wenigen Laboratorien durchgeführt werden konnte.

Soweit genügend Blut zur Verfügung stand, wurden von uns auch die Plasma-Reninaktivitäten neben der c.e.-A. bestimmt. PRA und Plasma-c.e.-A. wurden bei 7 Kindern gemessen, die zur Abklärung verschiedener Befunde in der Universitätskinderklinik München aufgenommen worden waren. Die Reninaktivitäten wurden mit dem Angiotensin-Rattentest (Boucher-Methode), die c.e.-A. mit der beschriebenen fluorimetrischen

bei 3 verschiedenen pH-Werten ermittelt. Ohne Ausnahme war in allen Fällen eine hohe PRA von einer niedrigen c.e.-A. begleitet. Ebenso wurden bei den Patienten mit einer hohen c.e.-A. eine relativ niedrige PRA bestimmt. In Abb. 45 ist auf der Ordinate die PRA und auf der Abszisse die c.e.-A. aufgetragen. Die Kurven haben ein hyperbelartiges Aussehen. Dieses Verhalten legt die Annahme eines Rückkoppelungsmechanismus nahe, der die Plasma-A II-Aktivität reguliert.

Auch bei Tierversuchen haben wir bereits mögliche Anzeichen für einen solchen Mechanismus beobachtet: So führt eine NaCl-reiche Diät bei Ratten zu einer erhöhten c.e.-A. im Bereich der Glomeruli, während die JGA-Reninaktivität vermindert wurde. Eine NaCl-arme Ernährung zeigte umgekehrten Effekt.

Bei Nierenarterienabklemmungen und bei den Hämorrhagieversuchen verhielten sich die Renin- und c.e.-A. jedoch gleichsinnig. In diesen Fällen ist möglicherweise die erhöhte A II-Aktivität für den Organismus zur Aufrechterhaltung der Homöostase von besonderer Bedeutung.

Die c.e.-A. von 8 gesunden Personen, die ebenfalls fluorimetrisch bei 3 verschiedenen pH-Werten ermittelt wurde, betrug bei pH 5,0 8,63 $\pm$ 8,94 Skt (n = 8), bei pH 6,0 9,25 $\pm$ 11,33 Skt (n = 6) und bei einem pH von 8,0 31,31 $\pm$ 10,91 Skt (n = 8).

Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß die bei pH 6,0 gemessene Plasma-c.e.-A. bei den Kranken in den meisten Fällen gegenüber pH 8,0 erhöht ist, während bei den gesunden Versuchspersonen bei pH 8,0 die höheren c.e.-A. gemessen wurden. Das legt die Annahme nahe, daß unter besonderen Bedingungen eine erhöhte Nierenrinden-c.e.-A. im Plasma bestimmt werden kann, was für diagnostische Zwecke nützlich sein könnte. Weitere Untersuchungen zur Klärung dieser Frage sind beabsichtigt.

IV) Zusammenfassung

Zum Studium der physiologischen Funktion des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) ist es notwendig, das Verhalten aller beteiligten enzymatischen Komponenten zu untersuchen, da es zur Zeit noch nicht möglich ist, Angiotensin II (A II), die einzige biologisch wirksame Substanz des Systems, in den Mikrostrukturen analytisch zu erfassen, in denen es zur Wirkung kommt.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein Beitrag zum Verhalten und der Lokalisation des converting enzymes (c.e.) geleistet werden. Dazu wurde es notwendig, eine empfindliche Methode zu entwickeln, die es ermöglicht, dieses Enzym in mikrodissezierten Gewebsstrukturen nachzuweisen. Durch Modifikation der von D. Cushman et al. und von Piquilloud et al. entwickelten Verfahren war es möglich, c.e.-Aktivität in einzelnen Glomeruli quantitativ zu messen.

Da das c.e. vornehmlich in Lunge, Hoden und Plasma, das Renin dagegen in den juxtaglomerulären Apparaten (JGA) der Niere vorkommt, standen diese Organe im Vordergrund des Interesses.

Es konnte festgestellt werden, daß die in der Niere enthaltene c.e.-A. mit großer Wahrscheinlichkeit einem Isoenzym zukommt, da sich pH-Optimum, Michaelis-Konstante und Blockierungsvermögen deutlich von denen der anderen unterscheiden.

Die pH-Optima für das Lungen-, Plasma- und Hoden-c.e. lagen übereinstimmend bei pH 8,0, während das der Nierenrinde bei pH 6,0 gemessen wurde.

Als K_m wurde 86,5 $\pm$ 9,3 µmol für die Lunge, 70,5 $\pm$ 19,6 µmol für das Plasma, 36,9 $\pm$ 17,4 µmol für den Hoden und 23,2 $\pm$ 7,4 µmol für die Niere bestimmt. Das Nieren-c.e. war im Gegensatz zum Lungen-, Plasma- und Hodenenzym kaum durch EDTA hemmbar und auch in NaCl-freier Lösung aktiv.

In den tubulären Strukturen der Niere wurde eine höhere c.e.-A. als in den juxtamedullären Glomeruli (mit JGA) gemessen. Ein noch geringerer c.e.-Gehalt wurde bei den superfiziellen

Glomeruli festgestellt. In der Lunge wurden in der A. pulmonalis die höchsten c.e.-Aktivitäten nachgewiesen.

Durch NaCl-reiche Diät wurde die c.e.-A. der Glomeruli erhöht, durch NaCl-arme Diät erniedrigt.

Nach temporärer Abklemmung einer Nierenarterie wurde neben der erhöhten JGA-Reninaktivität eine gesteigerte JGA-c.e.-A. gemessen. Auch bei experimenteller Hämorrhagie stieg die Plasma-c.e.-A. parallel zum Renin um das Zwei- bis Dreifache an. Die JGA-Angiotensinasen-Aktivität war dagegen in der abgeklemmten Niere signifikant erniedrigt.

Zwischen der Plasma-Renin-Aktivität (PRA) und der Plasma-c.e.-A. wurde bei 7 Nierenkranken ein etwa umgekehrt proportionales Verhalten festgestellt, das vermuten läßt, daß zwischen dem Renin und dem c.e. ein Rückkoppelungsmechanismus besteht.

V) Abkürzungen

A I	Angiotensin I
A II	Angiotensin II
c.e.	converting enzyme
c.e.-A.	converting enzyme-Aktivität
FG	Feuchtgewebe
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HHL	Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin
JGA	juxtaglomerulärer Apparat
JGA's	juxtaglomeruläre Apparate
KG	Körpergewicht
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
MG	Molekulargewicht
PRA	Plasma-Renin-Aktivität
Z	Benzyloxycarbonyl

VI) Literatur

1. Aiken, J.W., und J.R. Vane:
   Renin-angiotensin system: Inhibition of converting enzyme in isolated tissues.
   Nature (Lond.) 228, 30-34 (1970)

2. Alabaster, V.A., und Y.S. Bakhle.
   Inactivation of bradykinin in the pulmonary circulation of isolated lungs.
   Br.J.Pharmacol. 45, 299-310 (1972)

3. Allen, F.B., und J.P. Gilmore:
   Influence of altering total body sodium on angiotensin I systemic converting activity.
   Proc. Soc. for Exptl. Biol. and Med. 148, 511-515 (1975)

4. Aida, M., und M. Maebashi:
   Changes in plasma renin during sodium depletion in man.
   Tohoku J. Exper. Med. 87, 35 (1965)

5. Bakhle, Y.S..
   Conversion of angiotensin I to angiotensin II by cell-free extracts of dog lung.
   Nature 220, 919-921 (1968)

6. Bakhle, Y.S., A.M. Reynard und J.R. Vane:
   Metabolism of the angiotensins in isolated perfused tissues.
   Nature (Lond.) 222, 956-959 (1969)

7. Biron, P., L. Campeau und P. David:
   Fate of angiotensin I and II in the human pulmonary circulation.
   Amer. J. Cardiol. 24, 544-547 (1969)

8. Biron, P., und L. Campeau:
   Pulmonary and extrapulmonary fate of angiotensin I.
   Rev. Can. Biol. 30, 27-34 (1971)

9. Biron, P., und C.G. Huggins:
   Pulmonary activation of synthetic angiotensin I.
   Life Sci. 7 (I), 965-970 (1968)

10. Boucher, R., J. Asselin und J. Genest:
    A new enzyme leading to the direct formation of angiotensin I.
    Circ. Res. 34 (Suppl. I) I, 203-209 (1974)

11. Boucher, R., H. Kurihara, C. Grisé und J. Genest.
    Measurement of plasma angiotensin I converting enzyme activity.
    In: Hypertension XVIII: Mechanisms of Hypertension, ed. by F.M. Abboud. Circ. Res. 26 and 27 (Suppl. I) I, 83-I-92 (1970)

12. Boucher, R., M. Saidi und J. Genest:
A new "angiotensin I converting enzyme" system.
In: Hypertension 72, ed. by J. Genest and E. Koiw, Berlin-Heidelberg-New York, Springer-Verlag, 512-523 (1972)

13. Boyd, G.W., J. Landon und W.S. Peart:
Radioimmunoassay for determining plasma-levels of angiotensin II in man.
Lancet 2, 1002-1005 (1967)

14. Bumpus, F.M., H. Schwarz und J.H. Page:
Partial separation of an oxytocic principle from preparations of angiotensin.
Circ. Res. 4, 448 (1956)

15. Bumpus, F.M., R.R. Smeby und J.H. Page:
Angiotensin, the renal pressor hormone.
Circ. Res. 9, 762-766 (1961)

16. Cushman, D.W., und H.S. Cheung:
Spectralphotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung.
Biochem. Pharmacol. 20, 1637-1648 (1971)

17. Cushman, D.W., und H.S. Cheung:
Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat.
Biochim. Biophys. Acta 250, 261-265 (1971)

18. Cheung, H.S., und D.W. Cushman:
Inhibition of homogeneous angiotensin-converting enzyme of rabbit lung by synthetic venom peptides of Bothrops jararaca.
Biochim. Biophys. Acta 293, 451-463 (1973)

19. Dahlheim, H., K. Petschauer und K. Thurau:
Anreicherung und Charakterisierung der Erythrozytenangiotensinase.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 305, 105 (1969)

20. DiSalvo, J., A. Peterson, C. Montefusco und M. Menta:
Intrarenal conversion of angiotensin I to angiotensin II in the dog.
Circ. Res. 29, 398-406 (1971)

21. Dorer, F.E., J.R. Kahn, K.E. Lentz, M. Levin und L.T. Skeggs:
Hydrolysis of bradykinin by angiotensin converting enzyme.
Circ. Res. 34, 824-827 (1974)

22. Eisenbach, G.M., und J.B. VanLiew:
Effect of angiotensin on glomerular filtration of albumin.
II Nephrol. Symposium Hannover, 1974

23. Eilsseeva, Y.E., V.N. Orekhovich, L.V. Pavlikhina und L.P. Alexeenko:
Carboxycathepsin - A key regulatory component of two physiological systems involved in regulation of blood pressure.
Clin. Chim. Acta 31, 413-419 (1971)

24. Erdös, E.G., und H.Y.T. Yang:
An enzyme in microsomal fraction of kidney that inactivates bradykinin.
Life Sci. 6, 569-574 (1967)

25. Ferreira, S.H., D.C. Bartelt und L.J. Greene:
Isolation of bradykinin-potentiating peptides from Bothrops jararaca venom.
Bioch. 9, No. 13, 2583-2592 (1970)

26. Fitz, A., und M. Overturf:
Molecular weight of human angiotensin I lung converting enzyme.
J. Biol. Chem. 247, 581-584 (1972)

27. Fowler, N.O., und J.C. Holmes:
Coronary and myocardial actions of angiotensin.
Circ. Res. 14, 191 (1964)

28. Franklin, W.G., M.J. Peach und J.P. Gilmore:
Evidence for the renal conversion of angiotensin I in the dog.
Circ. Res. 27, 321-324 (1970)

29. Granger, P., H. Dahlheim und K. Thurau:
Enzyme activities of the single juxtaglomerular apparatus in the rat kidney.
Kidney Intern. 1, 78-88 (1972)

30. Gross, F.:
Renin und Hypertensin, physiologische oder pathologische Wirkstoffe?
Klin. Wochschr. 36, 693 (1958)

31. Gross, F., und K.D. Bock:
Some contributions to the pharmacology of synthetic angiotensin.
Circulation 25, 193 (1962)

32. Gross, F., und H. Turrian:
Pharmacology of hypertensin and sympathetic analogs.
In: Schachter, M.: Polypeptides which affect smooth muscles and blood vessels. New York. Pergamon Press (1960)

33. Guder, W., E. Siess und O. Wieland:
Studies on glucose synthesis in rat kidney cell suspensions.
FEBS-Letters 3, 31 (1969)

34. Guder, W., W. Wiesner, B. Stukowski und O. Wieland:
Metabolism of isolated kidney tubules.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie 352, 1319-1328 (1971)

35. Haber, E., S. Oparil und G. Tregar:
Sites and mechanisms of the conversion of angiotensin I to II.
In: Hypertension 72, ed. by J. Genest and E. Koiw, Berlin-Heidelberg-New York, Springer-Verlag, 563-569 (1972)

36. Helmer, O.M.:
Differentiation between two forms of angiotonin by means of spirally cut strips of rabbit aorta.
Amer. J. Physiol. 188, 571-577 (1957)

37. Hofbauer, K.G., H. Zschiedrich, W. Rauh, H. Orth und F. Gross:
Reaction of endogenous renin with exogenous renin substrate within the isolated perfused rat kidney.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142, 796-799 (1973)

38. Huggins, C.G., R.J. Corcoran, J.S. Gordon, H.W. Henry und J.P. John:
Kinetics of the plasma and lung angiotensin I converting enzymes.
Circ. Res. 27, suppl. 1, 1-93 (1970)

39. Huggins, C.G., und N.S. Thampi:
A simple method for the determination of angiotensin I converting enzyme.
Life Sci. 7, 633-639 (1968)

40. Igic, R., E.G. Erdös, H.S.J. YEH, K. Sorrells und T. Nakajima:
Angiotensin I converting enzyme of the lung.
Circ. Res. 31, suppl. II, 51-61 (1972)

41. Igic, R., T. Nakajima, H.S.J. Yeh, K. Sorrells und E.G. Erdös:
Kininases.
In: Pharmacology and the Future of Man, vol. 5, Proc. 5th Intern. Congr. Pharmacol., San Francisco 1972, ed. by G. Acheson, Karger Basel, 307-319 (1972)

42. Igic, R., H.S.J. Yeh, K. Sorrells und E.G. Erdös:
Cleavage of active peptides by a lung enzyme.
Experientia 28, 135-136 (1972)

43. Khairallah, P.A., und I.H. Page:
Mechanism of action of angiotensin and bradykinin on smooth muscle in situ.
Amer. J. Physiol. 200, 51 (1961)

44. Kuschinsky, G., und H. Lüllmann:
Über die Wirkung von synthetischem Hypertensin auf Kammer- und Vorhofmuskulatur der Katze.
Klin. Wochschr. 37, 928 (1959)

45. Lanzillo, J.J., und B.L. Fanburg:
Membrane-bound angiotensin-converting enzyme from rat lung.
J. Biol. Chem. 249, 2312-2318 (1974)

46. Lee, H.-J. J.N. Larue und I.B. Wilson:
Angiotensin-converting enzyme from guinea pig and hog lung.
Biochim. Biophys. Acta 250, 549-557 (1971)

47. Lee, H.J., J.N. Larue und I.B. Wilson:
Dipeptidyl carboxypeptidase from Coryne bacterium equi.
Biochim. Biophys. Acta 250, 608-613 (1971)

48. Lentz, K.E., L.T. Skeggs, K.R. Woods, J.R. Kahn und N.P. Shumway:
Amino acid composition of hypertensin II and its biochemical relationship to hypertensin I.
J. Exp. Med. 104, 183-191 (1956)

49. Leyssac, P.P.: Intrarenal function of angiotensin,
Fed. Proc. 26, 55 (1967)

50. Lineweaver, H., und D. Burk:
Determination of enzyme dissociation constants.
J. Amer. Chem. Soc. 56, 658-666 (1934)

51. Meier, R., F. Gross, J. Tripod und H. Turrian:
Pharmakologische Charakterisierung von synthetischem Hypertensin.
Experientia 13, 361 (1957)

52. Mendelsohn, F.:
Direct evidence for local formation of angiotensin II (A II) in kidney. Abstracts of Free Communications.
VIth Intern. Congr. Nephrol., Florence (1975)

53. Merrill, J.E., M.J. Peach und J.P. Gilmore:
Angiotensin I conversion in the kidney and its modulation by sodium balance.
Amer. J. Physiol. 224, 1104-1108 (1973)

54. Morris, B.J., und J. Johnston:
Renin substrate in discrete granules in rat kidney cortex.
Abstracts of Free Communications 342,
VIth International Congr. Nephrol., Florence 1975

55. Mouw, D., J.P. Bonjour, R.L. Malvin und A. Vander:
Central action of angiotensin in stimulating ADH release.
Amer. J. Physiol. 220, 239-242 (1971)

56. Nakajima, T., G. Oshima, H.S.J. Yeh, R. Igic und E.G. Erdös:
Purification of the angiotensin I converting enzyme of the lung.
Biochim. Biophys. Acta 315, 430-438 (1973)

57. Ng, K.K.F., und J.R. Vane:
Conversion of angiotensin I to angiotensin II.
Nature (Lond.) 216, 762-766 (1967)

58. Ng, K.K.F., und J.R. Vane:
Fate of angiotensin I in the circulation.
Nature (Lond.) 218, 144-150 (1968)

59. Ochwadt, B., H.D. Lowitz und K.O. Stumpe:
Influence of angiotensin on tubular function studied by mirco-puncture techniques in the rat.
Proc. IVth Intern. Congr. Nephrol. Stockholm, Abstract I Free Communications (1969)

60. Oparil, S., und C.A. Sanders:
In vivo and in vitro conversion of angiotensin I to angiotensin II in dog blood.
Circ. Res. 26, 591-599 (1970)

61. Oparil, S., G.W. Tregear, T. Koerner, B.A. Barnes und E. Haber:
Mechanism of pulmonary conversion of angiotensin I to angiotensin II in the dog.
Circ. Res. 29, 682-690 (1971)

62. Oshima, G., und E.G. Erdös:
Inhibition of the angiotensin I converting enzyme of the lung by a peptide fragment of bradykinin.
Experientia 30, 733-734 (1974)

63. Oshima, G., A. Gecse und E.G. Erdös:
Angiotensin I converting enzyme of the kidney cortex.
Biochim. Biophys. Acta 350, 26-37 (1974)

64. Page, I.H., und F.M. Bumpus:
Angiotensin.
Physiol. Rev. 41, 331 (1961)

65. Palaic, D.:
Effect of angiotensin on noradrenalin-^{3}H accumulation and synthesis in vitro.
Canad. J. Physiol. Pharmacol. 49, 495-500 (1971)

66. Panisset, J.C.:
Effect of angiotensin on the release of acetylcholine from preganglionic and postganglionic nerve endings.
Canad. J. Physiol. Pharmacol. 45, 313-317 (1967)

67. Peach, M.J., W.H. Cline und D.T. Watts:
Release of adrenal catecholamines by angiotensin II.
Circ. Res. 19, 571 (1966)

68. Piquilloud, Y., A. Reinharz und M. Roth:
Studies on the angiotensin converting enzyme with different substrates.
Biochim. Biophys. Acta 206, 136-142 (1970)

69. Robertson, P.A., und D. Rubin:
Stimulation of intestinal nervous elements by angiotensin.
Brit. J. Pharmacol. 19, 5 (1962)

70. Roth, M., A.F. Weitzman und Y. Piquilloud:
Converting enzyme content of different tissues of the rat.
Experientia 25, 1247 (1969)

71. Roth, D. und M.:
Purification of angiotensin-converting enzyme from human seminal plasma.
Experientia 30, 686 (1974)

72. Ryan, J.W., J. Roblero und J.M. Stewart:
Inactivation of bradykinin in the pulmonary circulation.
Biochem. J. 110, 795-797 (1968)

73. Ryan, J.W., U.S. Ryan, D.R. Schultz, C. Whitaker, A. Chung und F.E. Dorer:
Short cummunications. Subcellular localization of pulmonary angiotensin-converting enzyme (kininase II).
Biochem. J. 146, 497-499 (1975)

74. Skeggs, L.T., J.R. Kahn und N.P. Shumway:
Preparation and function of the hypertensin-converting enzyme.
J. Exp. Med. 103, 295-299 (1956)

75. Skeggs, L.T., W.H. Marsh, J.R. Kahn und N.P. Shumway:
Existence of two forms of hypertensin.
J. Exp. Med. 99, 275-282 (1954)

76. Smith, U., und J.W. Ryan:
Fed. Proc. Fed. Amer. Sos. Exp. Biol. 32, 1957-1966 (1973)

77. Soffer, R.L., R. Reza und P.R.B. Caldwell:
Angiotensin-converting enzyme from rabbit pulmonary particles.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1720-1724 (1974)

78. Stamey, T.A.:
Renovascular hypertension.
Amer. J. Med. 38, 829 (1965)

79. Stanley, P., und P. Biron:
Pressor response to angiotensin I during cardio-pulmonary bypass.
Experientia 25, 46-47 (1969)

80. Steven, K.:
Effect of peritubular infusion of angiotensin II on rat proximal nephron function.
Kidney Int. 6, 73 (1974)

81. Stevens, R.L., E.R. Micalizzi, D.C. Fessler und D.T. Pals:
Angiotensin I converting enzyme of calf lung: Method of assay and partial purification.
Biochemistry 11, 2999-3007 (1972)

82. Thampi, N.S., und C.G. Huggins:
Angiotensin I converting enzyme activity of subtilisn BPA' (Nagarse), a crystalline enzyme from Bacillus subtilis.
Biochem. Pharmacol. 17, 2018-2019 (1968)

83. Tigerstedt, R., und P.G. Bergmann:
Niere und Kreislauf.
Skandinav. Arch. Physiol. 8, 223 (1898)

84. Tobian, L.:
Interrelationship of electrolytes, juxtaglomerular ceels and hypertension.
Physiol. Rev. 40, 280 (1960)

85. Tobian, L.:
Relationship of juxtaglomerular apparatus to renin and angiotensin.
Circulation 25, 189 (1962)

86. Thurau, K.:
Renal hemodynamics.
Amer. J. Med. 36, 698 (1964)

87. Thurau, K., H. Dahlheim und P. Granger:
On the local formation of angiotensin at the site of the juxtaglomerular apparatus.
In: Proc. 4th Intern. Congr. Nephrol., Stockholm 1969, vol. 2, Karger, Basel, 24-30 (1970)

88. Thurau, K., H. Dahlheim, A. Grüner, J. Mason und P. Granger:
Activation of renin in the single juxtaglomerular apparatus by sodium chloride in the tubular fluid at the macula densa.
Circ. Res. 31, II-182 (1972)

89. Thurau, K., und J. Schnermann:
Die Natriumkonzentration an den Macula Densa-Zellen als regulierender Faktor für das Glomerulumfiltrat.
Klin.Wochschr. 43, 140 (1965)

90. Thurau, K., J. Schnermann, W. Nagel, M. Horster und M. Wahl:
Comparison of tubular fluid in the macula densa segment as a factor regulating the function of the juxtaglomerular apparatus.
Circ. Res. 21, 79-90 (1967)

91. Ueda, E., H. Akutshu, T. Kokubu und Y. Yamamura:
Partial purification and properties of angiotensin I converting enzyme from rabbit plasma.
Jap. Circ. J. 35, 801-806 (1971)

92. Vander, A.J.:
Control of renin release.
Physiol. Rev. 47, 359-382 (1967)

93. Yang, H.Y.T., und E.G. Erdös:
Second kininase in human blood plasma.
Nature (Lond.) 215, 1402-1403 (1967)

94. Yang, H.Y.T., E.G. Erdös und Y. Levin:
A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin.
Biochim. Biophys. Acta 214, 374-376 (1970)

95. Yang, H.Y.T., E.G. Erdös, T.A. Jenssen und Y. Levin:
Characterization of an angiotensin I converting enzyme (abstr.).
Fed. Proc. 29, 281 (1970)

96. Yang, H.Y.T., E.G. Erdös und Y. Levin:
Characterization of a dipeptide hydrolase (kininase II: angiotensin I converting enzyme).
J. Pharmacol. Exp. Ther. 117, 291-300 (1971)

97. Yang, H.Y.T., T.A. Jenssen und E.G. Erdös:
Conversion of angiotensin I by kininase preparation (abstr.).
Clin. Res. 18, 88 (1970)

98. Yang, H.Y.T., und N.H. Neff:
Distribution and properties of angiotensin converting enzyme of rat brain.
J. Neurochem. 19, 2443-2450 (1972)

99. Yaron, A., D. Mylnar und A. Berger:
Dipeptidocarboxypeptidase from E. coli.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 897-902 (1972)

Herrn Privatdozent Dr. H. Dahlheim danke ich für das Thema, die mir zur Verfügung gestellten vielseitigen Arbeitsmöglichkeiten und seine hilfreiche Unterstützung.

Mein Dank gilt auch Fräulein Ch. Jenke, die diese Arbeit mit viel Sorgfalt geschrieben hat.

LEBENSLAUF

Am 14. April 1948 wurde ich als einziges Kind des Schornsteinfegermeisters Albrecht Schweisfurth und seiner Ehefrau Marianna, geb. Albers, in Hilchenbach geboren. Ich besuchte die Volksschule in Hilchenbach und wurde im März 1962 entlassen. Anschließend begann ich bei meinem Vater eine Lehre als Schornsteinfeger. Neben meiner Berufsausbildung erwarb ich an der Abendschule in Hüttental die Fachschulreife. Nach bestandener Gesellenprüfung besuchte ich das Siegerland-Kolleg in Hüttental und legte im Januar 1969 dort die Reifeprüfung ab. Im April 1969 begann ich mein Medizinstudium an der Universität München. Während meiner klinischen Semester erarbeitete ich am Physiologischen Institut der Universität München unter Anleitung von Herrn Privatdozent Dr. H. Dahlheim die experimentellen Grundlagen der vorliegenden Arbeit. Im Dezember 1974 legte ich in München das medizinische Staatsexamen ab. Von Januar bis August 1975 arbeitete ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter (DFG; Da 93/5) in der Arbeitsgruppe Dr. Dahlheim am Physiologischen Institut der Universität München auf dem Gebiet des Renin-Angiotensin-Systems. Seit September 1975 bin ich als Medizinalassistent an der Medizinischen Poliklinik München beschäftigt.

- . - . - . -